



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Μελέτη

In vitro κατασκευή ανασυνδυασμένων στελεχών
μεταξύ του εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και
Coxsackie A13

Τέκος Φώτιος
Λάρισα 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (Ε.ΔΙ.Π.) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ -
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

In vitro κατασκευή ανασυνδυασμένων στελεχών μεταξύ του
εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και coxsackie A13

In vitro construction of recombinant strains between Sabin 1 and
Coxsackie A13 strains

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας - Ιολογίας, από τον Σεπτέμβριο του 2016 έως τον Μάιο του 2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και την κ. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως και από καρδιάς τον διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την πολύτιμη γνώση, βοήθεια, κατανόηση, ενθάρρυνση και συμπαράστασή που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου - Μαρία, Γιώργο, Κώστα, Εύα, Ιωάννα και Χριστίνα - για τη βοήθεια τους αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to the Picornaviridae family. Their genome is a single-stranded RNA of positive polarity of approximately 7,500 bp and is surrounded by an icosahedral protein capsid. Human-enteroviruses are classified into four groups: EV-A, EV-B, EV-C and EV-D. Polio viruses, the most important member of group C, are distinguished in three serotypes (PV1, PV2, PV3) and are the causative agents of paralytic polio. Since 1960 two vaccines have been used to eliminate poliomyelitis, initially the IPV and afterwards the most effective one the OPV. However, the OPV showed the disadvantage of Vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) and Vaccine-Derived Polioviruses (VDPVs) through the accumulation of mutations and / or recombinations in the genome of attenuated Sabin strains.

In the present study, the recombinations resulting from the concomitant infection of Rd cells with Sabin 1 and Coxsackie A13 strains was performed. For this reason, specific primer pairs were designed and used in order to detect putative recombinations covering the entire genome of Sabin 1 and Coxsackie A13 viruses. PCR reactions were performed using the above pair of primers in order to amplify the respective segments. Cloning and sequencing of the PCR products and processing of the nucleotide sequences via bioinformatics programs was finally performed for the analysis of putative recombinants.

Seven different recombinations sites were obtained in the genomic regions 2A and 2B. At the same time, potential models of the secondary structure of RNA molecules were used for the sites where the recombinants were identified. A strong correlation between the recombination sites and the secondary structure of the RNA molecules was revealed.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7.500bp και περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο. Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες: EV-A, EV-B, EV-C και EV-D. Οι πολιοϊοί, το σημαντικότερο μέλος της ομάδας C, διακρίνονται σε τρεις ορότυπους (PV1, PV2, PV3) και είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Από το 1960 χρησιμοποιούνται δύο εμβόλια για την εξάλειψη της ασθένειας, αρχικά το IPV και κατόπιν το πιο αποτελεσματικό OPV. Ωστόσο, το OPV εμφάνισε το μειονέκτημα της εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis) και της κυκλοφορίας των εμβολιοπροερχόμενων πολιοϊών (VDPVs: Vaccine-Derived Polioviruses) μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμών στο γένωμα των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών Sabin.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη των ανασυνδυασμών που προέκυψαν έπειτα από ταυτόχρονη μόλυνση κυττάρων Rd χρησιμοποιώντας τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και Cocksackie A13. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση πιθανών ανασυνδυασμών που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα των ιών Sabin 1 και Cocksackie A13 και εκτελέστηκαν PCR αντιδράσεις χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ζεύγη για την ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων. Ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχιση των προϊόντων και επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής για την ανάλυση των ανασυνδυασμών.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψαν επτά διαφορετικοί ανασυνδυασμοί στις γενωμικές περιοχές 2A και 2B. Παράλληλα, σχεδιάστηκαν πιθανά μοντέλα της δευτεροταγούς δομής των RNA μορίων στις θέσεις όπου εντοπίστηκαν οι ανασυνδυασμοί, μέσω των οποίων δομών προέκυψε ισχυρή σύνδεση μεταξύ των θέσεων ανασυνδυασμού και της δευτεροταγούς δομής των RNA μορίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1 Ιστορία της πολιομυελιτιδας – εμβολίων	2
1.2 Βιολογία των εντεροϊών	4
1.3 Ταξινόμηση των εντεροϊών.....	5
1.4 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων	7
1.5 Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος	11
1.6 Κύκλος ζωής εντεροϊών	12
1.7 Παθογένεια.....	21
1.8 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών.....	22
1.9 Εμβόλια κατά των πολιοϊών	25
1.10 Επιδημιολογία	30
2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1 Πρότυπα στελέχη	35
3.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	35
3.3 Μέτρηση κυττάρων	36
3.4 Μέτρηση του ιικού τίτλου των δειγμάτων	37
3.5 Ταυτόχρονη μόλυνση κυττάρων με Sabin1 και CAV13.....	39
3.6 Εκχύλιση του ιικού RNA.....	40
3.7 Σχεδιασμός εκκινητών για την ανίχνευση ανασυνδυασμών.....	41
3.8 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	42
3.9 PCR για την ανίχνευση ανασυνδυασμών	42
3.10 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	44
3.11 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	45
3.12 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR	45
3.13 Επεξεργασία αλληλουχιών	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
4.1 PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση ανασυνδυασμών	49
4.2 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	51
4.3 Ανάλυση των ανασυνδυασμών	51
4.4 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των RNA μορίων στις περιοχές των ανασυνδυασμών.....	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68
6.1 ΕΙΚΟΝΕΣ	74
6.2 ΠΙΝΑΚΕΣ	75

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορία της πολιομυελίτιδας – εμβολίων

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η πολιομυελίτιδα είναι μια από τις αρχαιότερες ασθένειες που γνωρίζουμε. Η πρώτη αναφορά της ασθένειας που έχει διασωθεί εμφανίζεται σε μια



Εικόνα 1.1.1: Απεικόνιση του Roma, ενός Αιγύπτιου θυρωρού. Πιθανόν πρόκειται για την παλαιότερη διασωμένη εμφάνιση ενός θύματος της πολιομυελίτιδας

αιγυπτιακή στήλη που χρονολογείται μεταξύ 1.580 – 1.350 π.Χ. που απεικόνιζε ένα άτομο με ατροφικό άκρο [1]. Ο Βρετανός Dr Michael Unterwood αποπειράθηκε τη παρουσίαση των πρώτων κλινικών περιγραφών της πολιομυελίτιδας το 1789 μ.Χ., με αναφορές σε περιπτώσεις παράλυσης σε συνδυασμό με πυρετό. Η συνεισφορά του Von Heine το 1840 [2] και του Σουηδού Medin το 1891 [3] οδήγησαν στην αναφορά της παραλυτικής πολιομυελίτιδας ως ασθένεια Heine-Medin. Μία ακόμη αναφορά, από τους Charcot και Joffroy [4], περιέγραφε τις παθολογικές αλλαγές στους πρόσθιους κερατοειδείς κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης που προέρχονταν από την πολιομυελίτιδα.

Μέσα στον 20ο αιώνα μια νέα εποχή στην έρευνα και συγκεκριμένα γύρω από την πολιομυελίτιδα ξεκίνησε κάνοντας αντιληπτή τη μολυσματική φύση της ασθένειας. Ο Wickman [5] ανακάλυψε την μεταδοτική φύση της πολιομυελίτιδας, καθώς και τη σημασία των ασυμπτωματικά μολυσμένων ατόμων στην μετάδοση του πολιοϊού ενώ τέλος επισήμανε τον ρόλο της εντερικής μόλυνσης στην παθογένεια της ασθένειας. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε αργότερα από τον Task [6]. Οι ερευνητές από τη Βιέννη Landsteiner και Popper [7] απέδειξαν την μολυσματική φύση της πολιομυελίτιδας μεταδίδοντας επιτυχώς την κλινική πάθηση και την παθολογία της σε πύθικους εμβολιάζοντας τους με ομογενοποιημένο ιστό του κεντρικού νευρικού συστήματος ανθρώπων με πολιομυελίτιδα.

Ο Αυστραλός Karl Landsteiner και Erwin Popper ήταν οι πρώτοι που υπέθεσαν ότι η ασθένεια πρέπει να προέρχεται από ιούς το 1908. Δυστυχώς παρά την πρόοδο που σημειώθηκε, ένας αριθμός άτυχων παρανοήσεων αρχικά αποπροσανατόλισε τους



Εικόνα 1.1.2: Νοσοκομείο για άτομα με πολιομυελίτιδα το 1916 στην Νέα Υόρκη των ΗΠΑ.

επιστήμονες με αποτέλεσμα ανεπιτυχείς προσπάθειες για τον έλεγχο της ασθένειας. Οι λάθος αντιλήψεις προέρχονταν από την πεποίθηση ότι ο ιός ήταν αποκλειστικά νευρότροπος, ότι ο ρινοφάρυγγας ήταν η κύρια οδός εισόδου του ιού στο ΚΝΣ και ότι ο ιός εξαπλώνονταν στο νευρικό σύστημα πριν την ιαμμία και μέσω του

οσφρητικού νεύρου. Επιπρόσθετα απέτυχαν αρκετές προσπάθειες ανοσοποίησης, με ορισμένες να επιφέρουν καταστροφικά αποτελέσματα [8]. Αποτέλεσμα όλων αυτών ήταν η ύπαρξη ενός κλίματος απαισιοδοξίας στα μέσα του 20ου αιώνα σχετικά με το ενδεχόμενο ελέγχου της πολιομυελίτιδας, ακόμα και μεταξύ των επιστημόνων που εργάζονταν στον τομέα αυτό. Το 1945, ο Burnet έγραψε χαρακτηριστικά: «Το πρακτικό πρόβλημα της πρόληψης της παιδικής παράλυσης δεν έχει λυθεί. Είναι ακόμη αμφίβολο εάν θα μπορέσει να λυθεί ποτέ.» [9]. Η ανακάλυψη ότι ο ιός εισέρχονταν μέσω της στοματο-γαστρικής οδού και ότι η πάθηση του ΚΝΣ ακολουθούσε την ιαμμία ήταν αρκετά για να τονώσουν τις ελπίδες για αποτελεσματική ανοσοποίηση [10].

Ο Enders βασιζόμενος σε προϋπάρχουσες μελέτες [11] διεξήγαγε μια μελέτη – ορόσημο που έδειχνε ότι ο πολιοϊός μπορούσε να αναπαραχθεί σε μη-νευρική καλλιέργεια ιστών. Οι έρευνες αυτές είχαν σημαντικές επιπτώσεις για όλο τον τομέα της ιολογίας καθώς έδειχναν, πρώτον, ότι ο πολιοϊός αναπτύσσονταν σε διάφορες καλλιέργειες ιστών που δεν αντιστοιχούν με τους ιστούς που μολύνονταν κατά τη διάρκεια της πάθησης και, δεύτερον, ότι ο πολιοϊός κατέστρεφε κύτταρα με συγκεκριμένη κυτταροπαθολογική δράση. Τεστ οροεξουδετέρωσης φανέρωσαν τους τρεις ορότυπους των πολιοϊών [12], ενώ ορολογικά τεστ [13] επιβεβαίωσαν ότι τα περισσότερα μολυσμένα άτομα δεν εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα. Οι έρευνες αυτές αποτέλεσαν τα θεμέλια στη δημιουργία μιας κρίσιμης δομής για την ανάπτυξη ενός εμβολίου και διασαφήνισαν ένα πλήθος μπερδεμένων δεδομένων, όπως την φαινομενική παρουσία δευτερευόντων συμπτωμάτων της πολιομυελίτιδας.

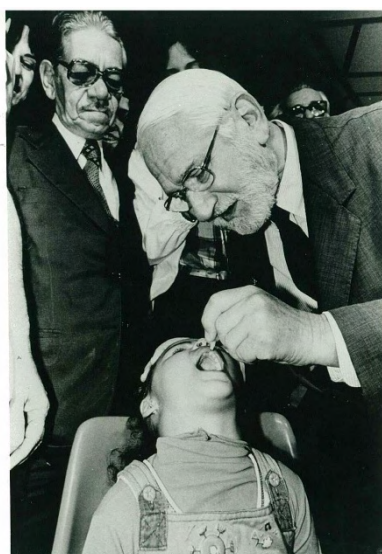
Διάφορα εμβόλια έχουν παραχθεί κατά το πέρασμα των χρόνων διαδοχικά, με τα πιο γνωστά να είναι το IPV (Salk inactivated polio vaccine), το οποίο χορηγούταν μέσω της

ενδομυϊκής οδού (αδειοδοτήθηκε το 1955 στις ΗΠΑ) και το ζωντανό-εξασθενημένο Sabin εμβόλιο OPV (oral polio vaccine) μέσω της στοματικής οδού (αδειοδοτήθηκε το 1961-1962). Η σημασία των εμβολίων αυτών και των ατόμων που τα παρήγαγαν αποδεικνύεται από το γεγονός ότι περισσότεροι Αμερικανοί γνώριζαν το όνομα του Jonas Salk παρά του προέδρου των ΗΠΑ. Αδιαμφισβήτητα ο πραγμα-



Εικόνα 1.1.3 Όλες οι εφημερίδες της εποχής μιλούν για τον μαχητή της πολιομυελίτιδας Jonas Salk και το επιτυχημένο του εμβόλιο

τικός αντίκτυπος των εμβολίων αυτών θα γίνει αντιληπτός όταν η πολιομυελίτιδα εξαλειφθεί από τον πλανήτη. Η εξάλειψη αναμφίβολα θα δώσει ένα δραματικό τέλος στη βίαιη ιστορία της πολιομυελίτιδας.



Εικόνα 1.1.4: 1961, ο Dr. Albert Sabin αναπτύσσει το OPV το οποίο γίνεται το εμβόλιο επιλογής για όλες σχεδόν τις χώρες του κόσμου.

Η μελέτη των πολιοϊών είχε μια συνεχή σημαντική επιρροή πάνω στον τομέα της μοριακής ιολογίας. Ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ζωικός ιός που κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε πλήρως [14,15], το πρώτο RNA ζωικού ιού για του οποίου δημιουργήθηκε ένας μολυσματικός κλώνος [16] και ο πρώτος ανθρώπινος ιός που είχε αποτυπωθεί η τρισδιάστατη δομή του μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-X [17]. Το 1989, ο Mendelson [18] ταυτοποίησε τον υποδοχέα του πολιοϊού, CD155, οδηγώντας στην γένεση διαγονιδιακών ποντικών που έφεραν τον υποδοχέα [19,20].

1.2 Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί όπως οι Echoviruses αλλά και οι Coxsackieviruses A και B, ανήκουν στην οικογένεια ιών Picornaviridae. Οι Picorna ιοί αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και περισσότερο ενεργές οικογένειες ιών που μελετώνται [21]. Τα μέλη αυτής της οικογένειας

είναι μη ελυτροφόροι ιοί και το γένωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας κι έχει μήκος περί τα 7.500 νουκλεοτίδια. Η οικογένεια αυτή των ιών περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των πολιοϊών, του ιού της Ηπατίτιδας Α, των ρινοϊών και του FMDV (foot and mouth disease virus). Υπάρχουν περίπου 100 ορότυποι εντεροϊών που προκαλούν ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματικές λοιμώξεις μέχρι πιο σοβαρές ασθένειες, όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση [22,23]. Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών είναι σύνθετο καθώς αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (pico) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA) [24].

1.3 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια *Picornaviridae* αποτελείται από 31 γένη σύμφωνα με τη νέα εγκεκριμένη από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) [25,26].

<i>Aphthovirus</i>	<i>Aquamavirus</i>	<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avisivirus</i>	<i>Cardiovirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Dicpivirus</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Erbovirus</i>	<i>Gallivirus</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hunnivirus</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>Kunsagivirus</i>	<i>Limnipivirus</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Mischivirus</i>	<i>Mosavirus</i>	<i>Oscivirus</i>	<i>Parechovirus</i>
<i>Pasivirus</i>	<i>Passerivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>	<i>Rosavirus</i>	<i>Sakobuvirus</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Sapelovirus</i>	<i>Senecavirus</i>	<i>Sicinivirus</i>	<i>Teschovirus</i>
<i>Tremovirus</i>				

Πίνακας 1.3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των 31 γενών της οικογένειας *Picornaviridae*

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται βάση των ομοιοτήτων που εμφανίζουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας και την οργάνωση του γονιδιώματος [24].

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό όσον αφορά τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο. Αρχικά, το γένος των εντεροϊών αποτελούνταν από μέλη που ανήκουν στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες: Πολιοϊοιοί (PV, ορότυποι 1-3), ιοί Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), ιοί Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και ιοί Echo (E, ορότυποι 1-33) [24]. Ωστόσο με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη με πολλαπλούς οροτύπους ο καθένας.

Οι Picorna ιοί είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς. Άσχετα από το μικρό και περιορισμένο τους μέγεθος, η εξέλιξη στους ιούς Picorna οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, των επονομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων. Ο ορότυπος προσδιορίζεται από τις συνδετικές θηλιές και τα C-τελικά άκρα των καψιδιακών πρωτεϊνών που περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια του ιοσωμάτιου. Αυτά περιλαμβάνουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις μπορούν να προσδώσουν «ανθεκτικότητα» έναντι μονοκλωνικών αντισωμάτων [24].

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και, σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Coxsackie A ή B και ιούς Echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά

Γένος εντεροϊών	Ορότυποι
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	54

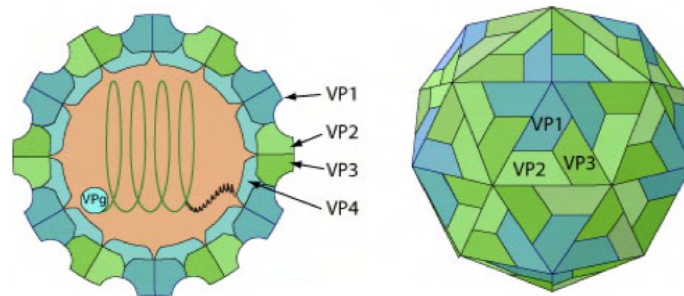
Πίνακας 1.3.2: Νέα ταξινόμηση εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους.

ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί Coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί Coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντί-ορών [24].

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [24,27]. Οι νέοι εντεροϊοί ταξινομούνται με χρονολογική σειρά δίνοντας τους έναν αύξοντα αριθμό (EV-X 68-121), όπου X το γράμμα της ομάδας στην οποία ανήκουν.

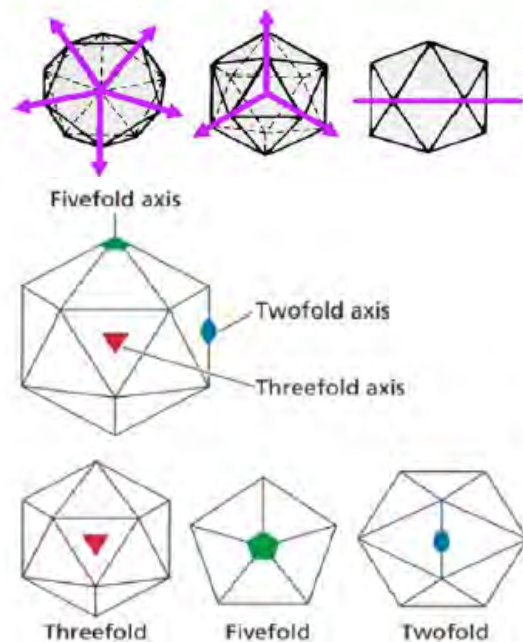
1.4 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα ιοσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες [28]. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και μπορούν να διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε pH 3, αλλά ακόμα και σε μικρότερες τιμές pH.



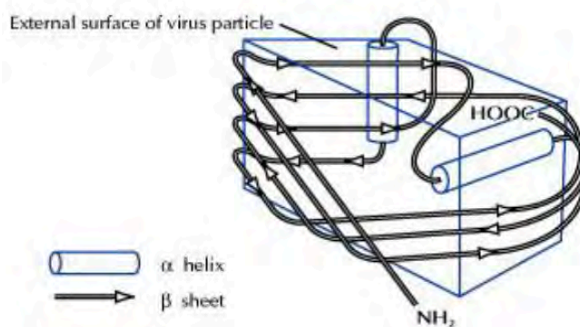
Εικόνα 1.4.1: Δομή ενός Picorna ιού

Τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [29-30], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες σε εικοσαεδρική συμμετρία. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών, βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών, βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [31]. Η γνώση μας για την δομή των πολιοϊών το 1985 αυξήθηκε άρδην όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X [32].



Εικόνα 1.4.2: Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο

Το βασικό θεμέλιο του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει 1 αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η εξωτερική πλευρά σχηματίζεται από την VP1 έως τη VP3 και η VP4 υπάρχει στην εσωτερική επιφάνεια [33]. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία αλληλουχική



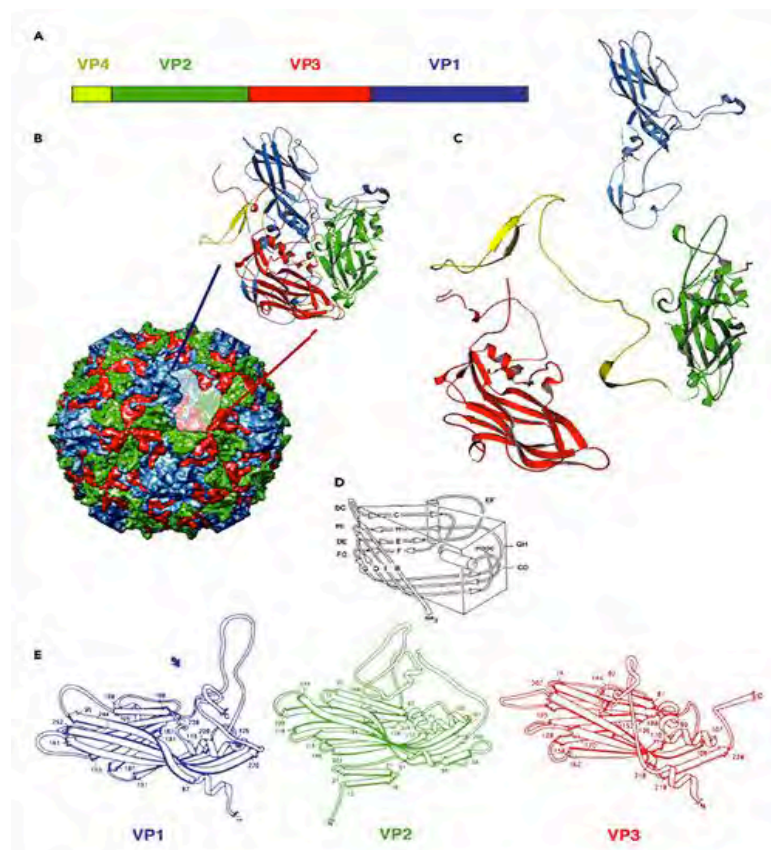
Εικόνα 1.4.3: Απεικόνιση του οκταπλού πλέγματος β'-βαρελίου

ομολογία, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Αυτό είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που έχει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Η VP4 διαφοροποιείται σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες στο ότι παρουσιάζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρόμοια στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3 και λειτουργεί σαν μια αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2 παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου.

Οι βασικές δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 οφείλονται στους βρόγχους που συνδέουν τα β'-strands και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που εξέχουν της περιοχής του β'-βαρελίου. Οι αμινοξικές αυτές αλληλουχίες δίνουν σε κάθε Picorna ιό την ξεχωριστή μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιοσωματίου και τα N-τελικά στο εσωτερικό του, δείχνοντας ότι προκύπτουν σημαντικές αναδιατάξεις του P1 προδρομού κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA και N-AgIIIB, [34].

Πιο αναλυτικά:

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIA αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIB από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.



Εικόνα 1.4.4: Δομικά χαρακτηριστικά των πολιοϊών

A. Η οργάνωση των δομικών πρωτεϊνών στο γένωμα του ιού.

B. Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου του πολιοϊού, όπου φαίνεται το πακετάρισμα των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου.

C. Τρισδιάστατα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4.

D. Διάγραμμα που απεικονίζει το πώς τα οχτώ β'-πλέγματα κάθε πρωτεΐνης σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους.

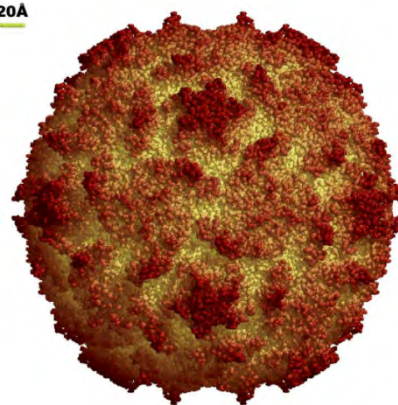
E. Διάγραμμα τύπου ribbon των VP1, VP2 και VP3 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελίου.

Σχετικά με την επιφάνεια του ιοσωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (plateau), με σχήμα αστεριού, βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (canyon) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Η αύλακα αυτή βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1, VP2, VP3. Αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς και είναι αρκετά μικρή, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση των ογκωδών αντισωμάτων.

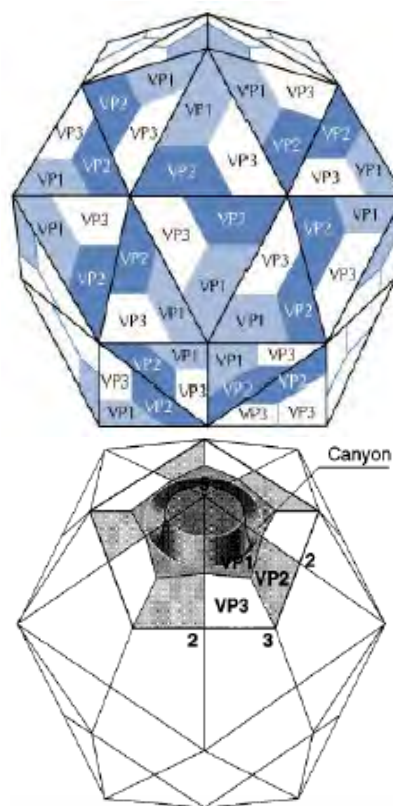
Στο εσωτερικό των ιοσωματίων, στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων της VP3 πρωτεΐνης σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β'-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β'-φύλλων προερχόμενα από το N-τελικό άκρο των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος συνδεδεμένη στο N-άκρο της VP4 επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών δομών [35]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα πλέγμα β'-φύλλων, που αποτελείται από 4 β'-πλέγματα του VP3 βαρελιού και ένα πλέγμα από το N-άκρο της VP1 που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β'-φύλλου του N-άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [36].

Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, πρόταση βασιζόμενη σε ευρήματα με τον ιό *bean rod*, ο οποίος σχετίζεται με τους ιούς Picorna. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την διάταξη του RNA των ιών Picorna. Στην ατομική δομή του πολιοϊού P2, οι βάσεις του RNA έχει παρατηρηθεί ότι συσσωρεύονται με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [37]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου ή την απέκδυση.

20A



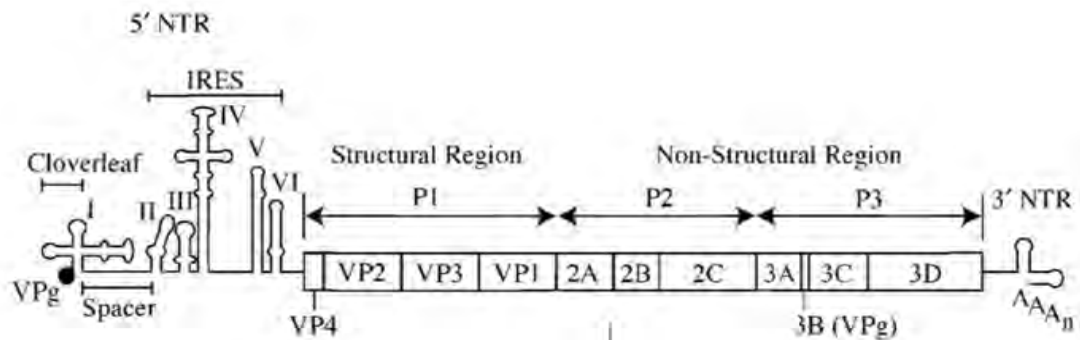
Εικόνα 1.4.5: Τρισδιάστατη δομή του πολιοϊού τύπου 1, όπου φαίνεται η δομή αστεριού (plateau)



Εικόνα 1.4.6: Σχηματική αναπαράσταση της αύλακας (canyon)

1.5 Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος

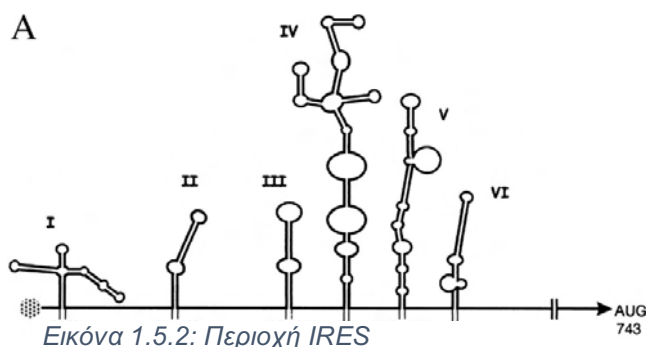
Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Από την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα ώστε να παραχθούν όλες οι πρωτεΐνες του ιού που είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή του. Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τα επιμέρους τμήματα: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την poly (A) ουρά, μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή.



Εικόνα 1.5.1: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών.

Το γένωμα των πολιοϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [29,38]. Η VPg ανιχνεύεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [39,40]. Το cloverleaf αποτελεί ένα cis-acting γενετικό στοιχείο σχήματος τριφυλλιού, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του RNA και στην έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου [41].

Η επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των εντεροϊών αποκάλυψε ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές τους είναι μακριές, περίπου 750 νουκλεοτίδια και υψηλά συντηρημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την



αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Ειδικότερα, περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNAs με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [42].

Τα αποτελέσματα βιοχημικών μελετών που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, θεώρησαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες [43]. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [14].

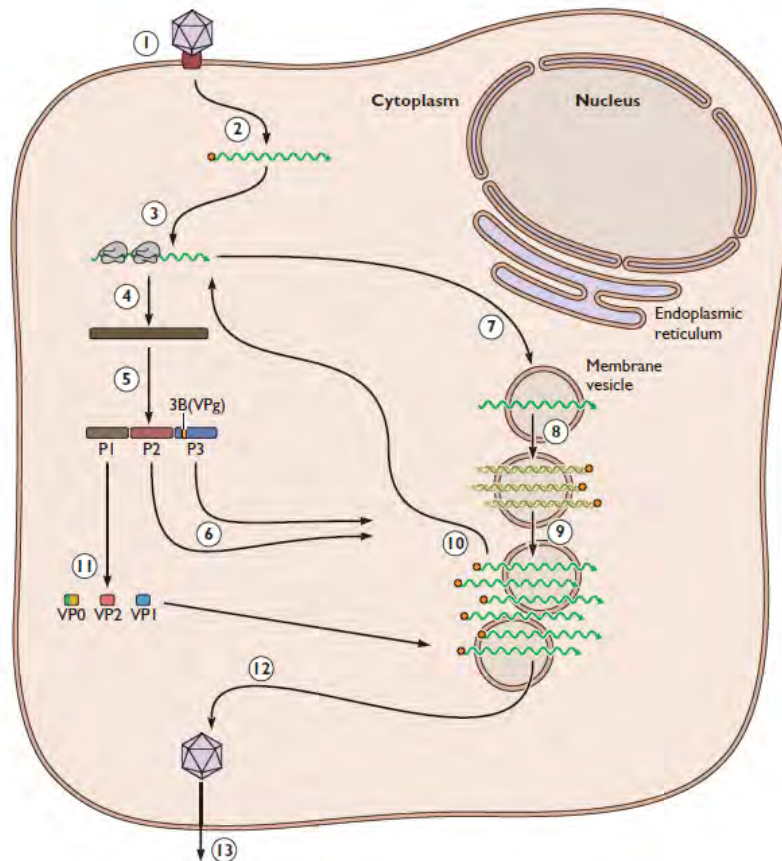
Τέλος, η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και διαθέτει μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [44]. Αυτή η νουκλεοτιδική περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA [45]. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητη ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [46,47]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρουν μια πολύ(A) ουρά [48].

1.6 Κύκλος ζωής εντεροϊών

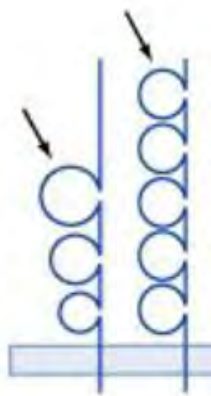
Η αντιγραφή των εντεροϊών πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα. Αρχή αποτελεί η σύνδεση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ενώ ακολουθεί η είσοδος στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Μετέπειτα λαμβάνει χώρα η διαδικασία της απέκδυσης, κατά την οποία το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα έπειτα από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται αμέσως μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Από την μετάφραση προκύπτει μία πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται και προκύπτουν τόσο οι δομικές, όσο και οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μία από τις λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία καταλύει την αντιγραφή. Η αντιγραφή του ιού γίνεται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Τα αντιγραφικά αυτά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει σε πρώτη φάση το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο με τη σειρά του θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των (+) RNA κλώνων θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA και ένα μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού λοιπόν γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και τέλος, η έξοδος του από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου [24].

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού, ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [42].

Παρακάτω αναλύονται τα στάδια του κύκλου ζωής που αναφέρθηκαν έως αυτό το σημείο:



Εικόνα 1.6.1: Αναπαράσταση του κύκλου ζωής των ιών Picorna



Εικόνα 1.6.2: Υποδοχέας πολιοϊών (PVR) δεξιά και ICAM-1 αριστερά

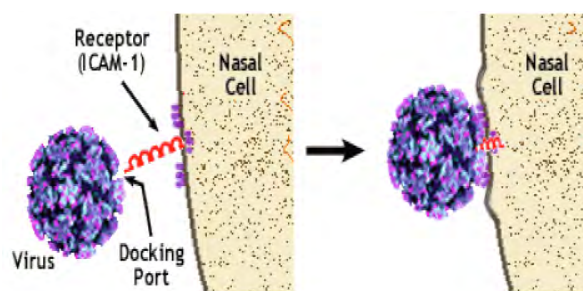
Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με τη σύνδεσή τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [49]. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Στην πλειοψηφία των εντεροϊών, οι υποδοχείς συνδέονται με τα

συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη αύλακα (canyon) και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [50].

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει, εν μέρει, την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών (αυτή που φαίνεται με το βελάκι στην εικόνα 1.6.2) [51,52].

Ορισμένα μέλη των εντεροϊών της ομάδας C, όπως για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie A (CAV 13,17,20,21,24), χρησιμοποιούν τον υποδοχέα ICAM-1 ή αλλιώς CD54 για την είσοδό



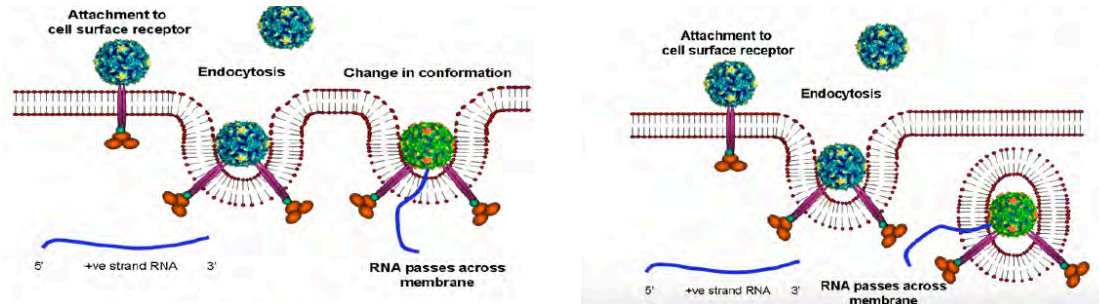
Εικόνα 1.6.3: Απεικόνιση του υποδοχέα ICAM-1 και της σύνδεσης με τον εντεροϊό.

τους στο κύτταρο ξενιστή [52]. Ο υποδοχέας αυτός είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος και αυτή της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η επαφή του εντεροϊού με τον υποδοχέα του, οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν, τα οποία καλούνται altered ή A σωματίδια, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4 (εικόνα 1.6.1, σημεία -1- και -2-). Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου επειδή είναι υδρόφοβη, βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων A [53], καθώς έχει αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια και επομένως το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα.

Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η

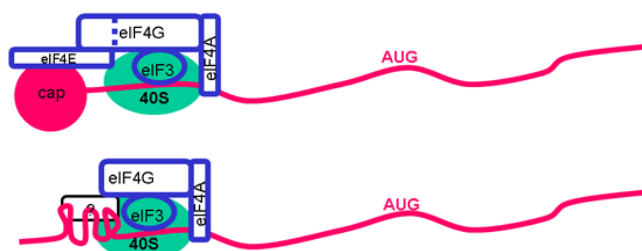
ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του [42].



Εικόνα 1.6.4: Μοντέλο εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο δεσμεύεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωμάτων A. Το ιικό RNA που φαίνεται σαν καμπυλωτή γραμμή εξέρχεται από το σωμάτιο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.

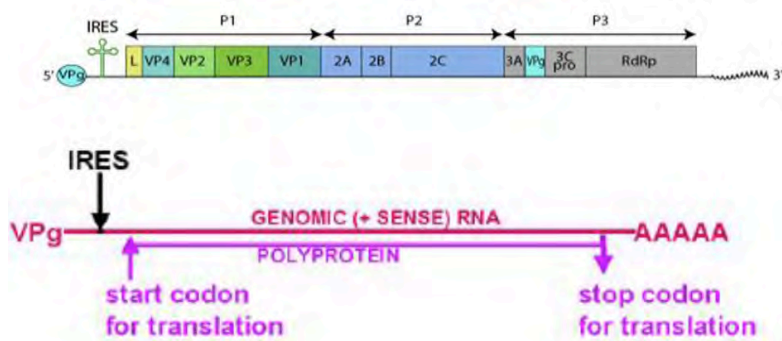
Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA που δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [54]. Αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού, ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο των εντεροϊών, αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο, που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [14,52]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).



Εικόνα 1.6.5: Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-καλύπτρα- εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η IRES-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES

Η σύνθεση των πρωτεϊνών των πολιοϊών γίνεται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό.



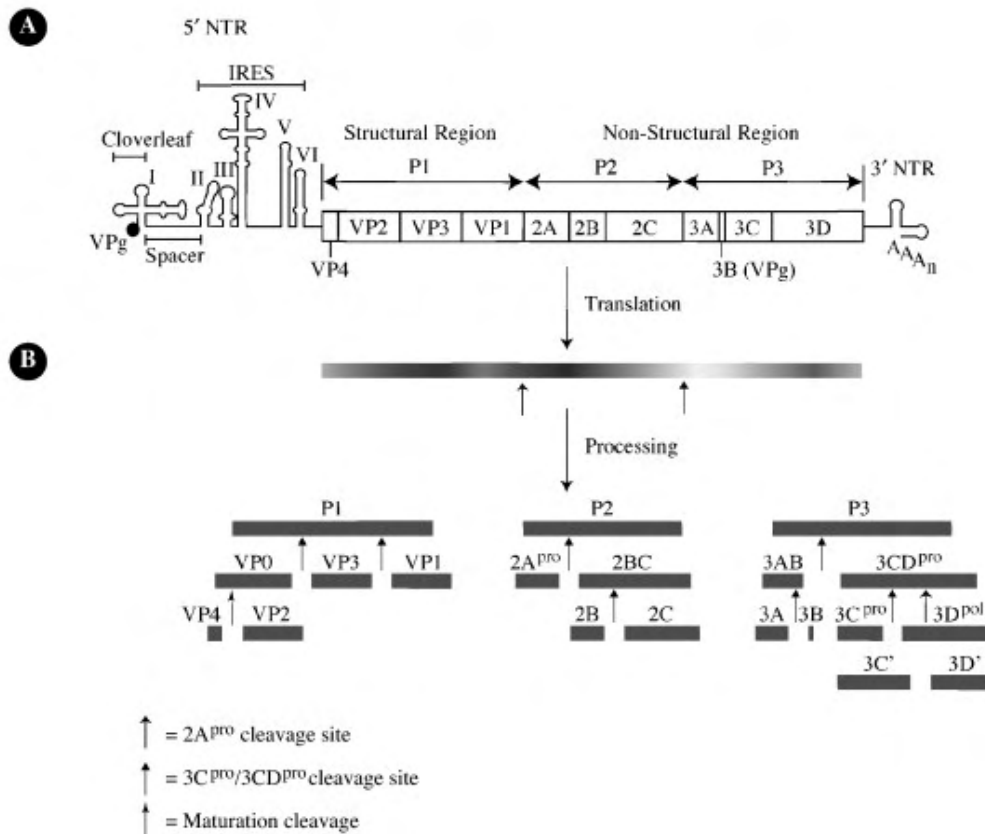
Εικόνα 1.6.6: Η πολυπρωτεΐνη από το ORF

Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα της σύνθεσης πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται παράλληλα με τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη δουλεύεται συµμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεΐνες: την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro} [42].

Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 2A^{pro} είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό-τεμαχισμό. Με το που ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη in trans. Αρχικά έχουμε την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2A^{pro}. Στη συνέχεια η 3CD^{pro} απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο μέσω αυτοκαταλυτικού τεμαχισμού. Η πρωτεΐνη αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, ξεκινάει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3C^{pro}. Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 3CD^{pro} επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστικότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης in-trans από την 3CD^{pro}, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3D^{pol} αλληλουχία μέσα στην 3CD^{pro} απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το 3C^{pro} μέρος του ενζύμου. Κατά το τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, όπου συμβαίνει συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση της πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστικότητες [42].

Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Αν και η διαδικασία της αντιγραφής του είναι αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ένα απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+) όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών.



Εικόνα 1.6.7: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

Η αντίδραση της αντιγραφής καταλύεται από την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ($3D^{pol}$) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης $3CD^{pro}$, η οποία είναι ιδιαιτέρως δραστική ως πρωτεΐνάση χωρίς ωστόσο να έχει δράση πολυμεράσης.

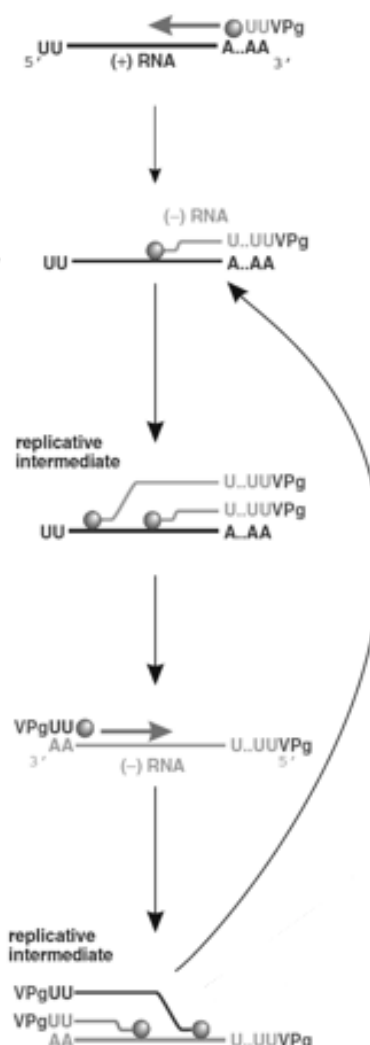
Η $3D^{pol}$ είναι ένα ένζυμο που χρειάζεται εκκινήτη για να ξεκινήσει να αντιγράφει. Σε πειράματα *in vitro* η $3D^{pol}$ δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινήτη. Η

VPg πρωτεΐνη παίζει αυτόν τον ρόλο -του εκκινήτη-, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των πολιοϊών [55,56,57]. Βάσιμες μελέτες δείχνουν ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [58,59].

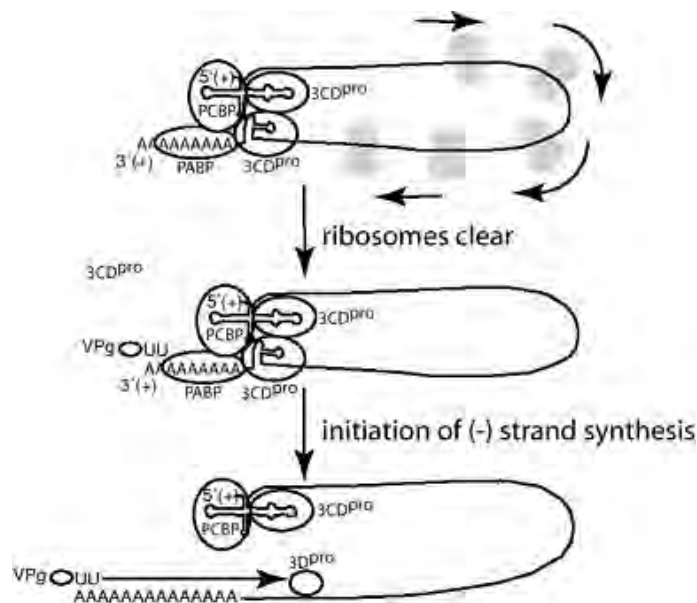
Η σύνθεση του ιικού mRNA και του ιικού γενώματος γίνονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Ιική μόλυνση οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi να καταστρέφονται κατά τη διαδικασία αυτή και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης [60,61], στην επιφάνεια των οποίων γίνεται η ιική σύνθεση του RNA [62,63,64]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής αυξάνοντας τα επίπεδα δραστηριότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ιικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινήτη VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3D^{pol} και την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [65].

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που



Εικόνα 1.6.8: Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού RNA



Εικόνα 1.6.9: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου.

σύνδεση της πολύ- $r(C)$ -δεσμευτικής πρωτεΐνης ($PCBP$ -βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η $3CD^{pro}$ συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, με συνέπεια την καταστολή της μετάφρασης και επαγωγή της σύνθεσης του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με επακόλουθο τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα [24].

Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων

Κατά την πρωτεϊνοσύνθεση της P1, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β -βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεΐνάση $3CD^{pro}$. Οι θέσεις κοπής εντοπίζονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β -βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Αυτή η διαδικασία παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς, με συντελεστή καθίζησης 14S [39,67].

αποτρέπει την ταυτόχρονη εκτέλεση των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA παίζει καθοριστικό ρόλο ρυθμίζοντας πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται [66]. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη τις πλειοψηφίας των VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνωση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες [39,67].

Η καψιδίωση των Picorna ιών έχει πολύ μεγάλη ειδικότητα καθώς οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [39,67]. Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, λόγω του γεγονότος ότι και ο αρνητικός κλώνος RNA περιέχει VPg όμως δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

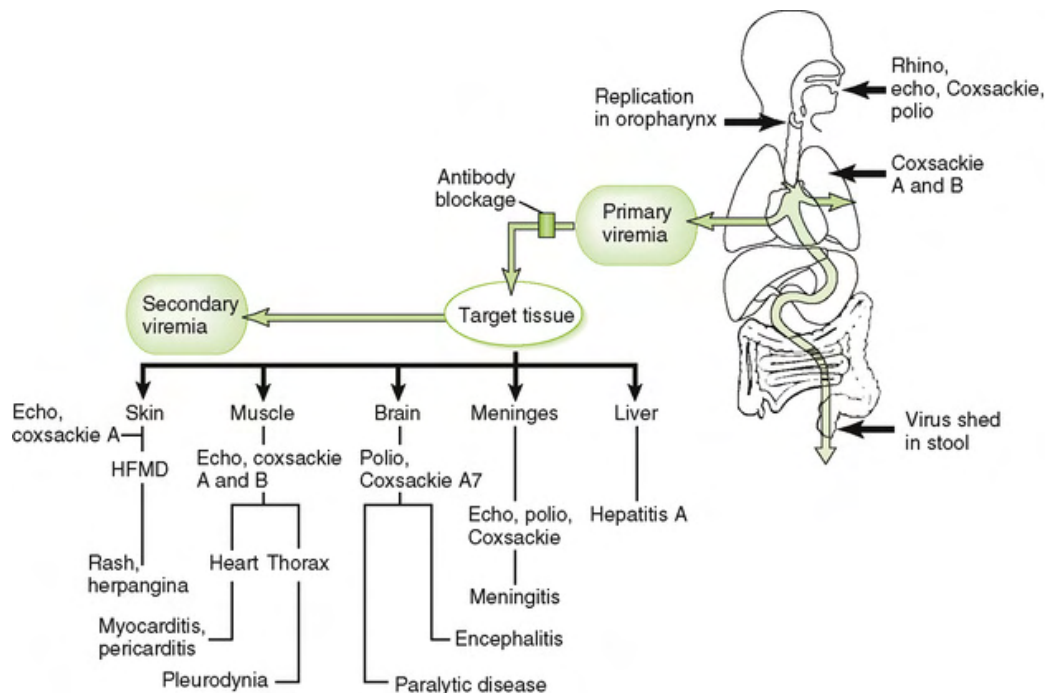
Κατά τη σύνθεσή της, η P1 συνδέεται με μυριστικό οξύ, σε ένα κατάλοιπο γλυκίνης στο αμινοξυτελικό άκρο της VP4, το οποίο είναι εκτεθειμένο μετά την απομάκρυνση του εναρκτήριου καταλοίπου Met [35]. Οι ομάδες μυριστικού, που σχηματίζουν μέρος του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων, όταν τα πρωτομερή συγκροτούνται σε πενταμερή, συγκεντρώνονται γύρω από τον πενταπλό άξονα συμμετρίας και σταθεροποιούν τον β-κύλινδρο που σχηματίζεται από τα αμινοξυτελικά άκρα πέντε αντιγράφων της VP3. Μεταλλάξεις φανερώνουν ότι οι ομάδες μυριστικού διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη σταθεροποίηση των πενταμερών και επομένως των ιικών σωματιδίων [68,69,70,71,72].

Υπό πειραματικές συνθήκες φαίνεται ότι ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, οδηγώντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Γνωστό επιπλέον είναι ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [73]. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιγράφονται από συμπύκνωση της χρωματίνης, πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων είναι άγνωστη προς το παρόν, ενώ μία υπόθεση που μπορεί να δοθεί είναι ότι η διαρροή των λυσοσωματικών περιεχομένων είναι εν μέρει υπεύθυνη [74].

1.7 Παθογένεια

Η ιική παθογένεια είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας ιός μολύνει έναν ξενιστή. Ως γνωστόν οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των ζωντανών κυττάρων και των ιστών.

Μία μόλυνση από εντεροϊό ξεκινάει από το πεπτικό σύστημα. Η είσοδος του εντεροϊού γίνεται κατά κύριο λόγο από το στόμα, με εξαίρεση τους Coxsackie A21 (CAV21) ο οποίος μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος και ο EV70, ο



Εικόνα 1.7.1: Παθογένεια εντεροϊών

ο οποίος εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων [24]. Σε ένα πρώτο στάδιο οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο προκαλώντας ιαιμία, που οδηγεί σταδιακά σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο-στόχο. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, κυμαίνεται συνήθως από 7 έως 14 ημέρες, ενώ σε ακραίες περιπτώσεις ακόμα και από 2 έως 35 ημέρες. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 έως και 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [28,77,78,79].

Ιοί πολιομυελίτιδας	
ΜΟΡΦΕΙΣ	
1	Ασυμπτωματική μορφή. Εμφανίζεται στο 90% των περιπτώσεων και ο ιός περιορίζεται στο στοματοφάρυγγα και στο έντερο χωρίς κανένα σύμπτωμα.
2	Εκτρωτική πολιομυελίτιδα. Εμφανίζεται στο 5% των περιπτώσεων ως ελαφρά εμπύρετη νόσος με μη ειδικά συμπτώματα.
3	Άσηπτη μηνιγγίτιδα. Εμφανίζεται στο 1-2% των περιπτώσεων με μηνιγγιδικά συμπτώματα, όπως δυσκαμψία, άλγος στη ράχη και τον αυχένα και μυϊκό σπασμό. Η νόσος διαρκεί 2-10ημ. Και η ανάρρωση είναι πλήρης.
4	Παραλυτική πολιομυελίτιδα. Εμφανίζεται στο 0,1-2% των περιπτώσεων. Ο ιός μεταφέρεται διά του αίματος και των νευραξόνων στο ΚΝΣ. Εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται στα κινητικά κύτταρα των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού και τους κινητικούς πυρήνες των εγκεφαλικών νεύρων.

Πίνακας 1.7.1: Κλινικά σύνδρομα προκαλούμενα από ιούς πολιομυελίτιδας.

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Πρόοδος στην κλινική εικόνα έπειτα από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [76,77,78,79].

1.8 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών

Δύο είναι οι βασικοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στη μεγάλη ποικιλομορφία και εξέλιξη των εντεροϊών: Οι μεταλλάξεις και ο ανασυνδυασμός [80].

Κάθε εντεροϊός έχει και το δικό του όργανο-στόχο. Συγκεκριμένα οι πολιοϊοί μπορούν να προσβάλλουν τα επιχώρια λεμφογάγγλια. Τότε εμφανίζονται τα πρώτα μη ειδικά συμπτώματα όπως κακή διάθεση, πυρετός, κεφαλαλγία και έμετος. Εφόσον προσβάλλονται κύτταρα του Κ.Ν.Σ. μπορεί να προκύψει μη παραλυτική πολιομυελίτιδα σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων ή παράλυση των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννοδών μεμβρανών [75,77,78,79]. Οι Cocksackie ιοί και οι ECHO-ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύτερο φάσμα νόσων.

Ιοί Cocksackie A	
1	Ερπητική κυνάγχη (1-6, 8, 10 και 22)
2	Νόσος χειρών, ποδών και στόματος (16, 4, 5, 9, 10)
3	Άσηπτη μηνιγγίτιδα (7, 9)
4	Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος (2, 10, 21, 24)
5	Εμπύρετο νόσημα κατά το θέρος
6	Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα (24)
7	Λοιμώξεις γαστρεντερικού συστήματος (4, 9, 18, 20-22, 24)
Ιοί Cocksackie B	
1	Επιδημική μυαλγία ή πλευρωδυνία (Νόσος Bornholm)
2	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
3	Μυοκαρδίτιδα - Περικαρδίτιδα (σε ενήλικες και νεογέννητα)
4	Εμπύρετο νόσημα κατά το θέρος

Πίνακας 1.7.2: Κλινικά σύνδρομα προκαλούμενα από ιούς Cocksackie A και B.

Μεταλλάξεις

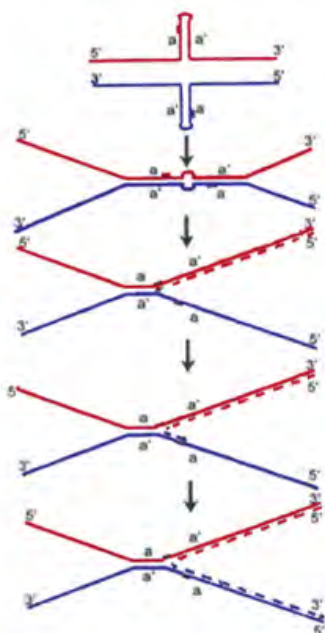
Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA βρίσκεται αφενός στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και αφετέρου στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών [81].

Στις πιο συχνές μεταλλάξεις απαντούν οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [82].

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι στην εξέλιξη του γενώματος των εντεροϊών παρατηρείται διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Άμεσο αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών, όπως ότι η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα. Μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα, δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, και οι μη δομικές πρωτεΐνες εξελίσσονται ανεξάρτητα [83].

Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών περιεγράφηκε για τους πολιοϊούς πρώτη φορά από τον Hirst το 1962. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης σε σχέση με τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός [84].



Εικόνα 1.8.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Παράλληλα, συμβάλλει στην δημιουργία ικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) [85,86].

Ο βασικός μηχανισμός για να συμβεί ανασυνδυασμός είναι ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικού κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, το ένζυμο μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας [87] ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο [88] και να σταματήσει τη σύνθεση του (-) RNA.

Αυτό έχει ως συνέπεια, η ιική 3D πολυμεράση να αποδεσμεύεται μαζί με το νεοσυντιθέμενο κλώνο και να μεταπηδά σε έναν άλλον RNA κλώνο θετικής πολικότητας, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει πλέον σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία χμαιρικών μορίων. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος [89], αντίθετα μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς.

Ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-) RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία.

Εκτός από τον αντιγραφικό μηχανισμό που περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω, ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί πολύ πιο σπάνια και μέσω του μηχανισμού ρήξης και επανένωσης. Ο μηχανισμός αυτός σε αντίθεση με τον προηγούμενο είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου [90].

1.9 Εμβόλια κατά των πολιοϊών

IPV

Το απενεργοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) προήλθε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεΰδη. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Πλεονέκτημα του είναι και το στοιχείο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια και ανοσοκαταστολή. Ωστόσο, το IPV δεν επάγει επαρκή τοπική ανοσία. Επίσης είναι ακριβότερο σε σχέση με το OPV και εμφανίζει μειωμένη γαστρεντερική ανοσία σε σχέση με τη φυσική μόλυνση. Τέλος, εγκυμονούν ορισμένοι κίνδυνοι καθώς για την παραγωγή του χρησιμοποιούνται πολιοϊοί αγρίου τύπου [91].

OPV

Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων in vitro και in vivo κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα υγιών παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b) προήλθε από το άγριο νευροτοξικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας [92].

Η μοριακή βάση της εξασθένησης (όπου ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί ασθένεια) ή της μεταστροφής των εμβολιακών στελεχών (όπου ο ιός επανακτά την ικανότητα να προκαλεί ασθένεια) έχει μελετηθεί συγκρίνοντας την αλληλουχία του εμβολιακού στελέχους του κάθε οροτύπου με αυτή ενός συγγενούς στελέχους, είτε του προδρόμου του εμβολιακού στελέχους είτε ενός νευρομολυσματικού στελέχους που

απομονώθηκε από περίπτωση VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis) [91].

Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P3/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P3/Leon/37) σε 11 βάσεις από τις οποίες όμως μόνο οι δύο είναι ισχυροί καθοριστές του εξασθενημένου / νευρομολυσματικού φαινοτύπου: μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 91 της VP3 περιοχής. Επίσης, η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 6 της VP1 είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στον εξασθενημένο φαινότυπο.

Στην περίπτωση του εμβολιακού στελέχους P2/Sabin, μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1 περιοχής είναι οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου / νευρομολυσματικού φαινοτύπου.

Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P1/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P1/Mahoney/41) σε 54 βάσεις. Οι καθοριστές του εξασθενημένου φαινοτύπου του P1/Sabin βρέθηκε ότι κατανέμονται σε όλο το γένωμα καθιστώντας την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη από αυτή των άλλων δύο οροτύπων. Μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 480 της 5'-NTR περιοχής και πιθανόν μία δεύτερη στη θέση 189 της ίδιας περιοχής έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Τέσσερις επιπλέον αμινοξικές υποκαταστάσεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Οι δύο από αυτές (τα αμινοξέα 65 της VP4 και 134 VP1) βρίσκονται στο εσωτερικό του ιικού καψιδίου ενώ οι άλλες δύο (τα αμινοξέα 106 της VP1 και 225 της VP3) βρίσκονται στο εξωτερικό του. Επιπλέον ασθενείς καθοριστές του εξασθενημένου / νευρομολυσματικού φαινοτύπου βρίσκονται στο 3' τελικό άκρο του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στη θέση 73 της 3D^{pol} περιοχής.

Το OPV έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το IPV:

- ✓ Το OPV χορηγείται από το στόμα και όχι σε ενέσιμη μορφή όπως γίνεται στην περίπτωση του IPV.
- ✓ Το OPV επάγει μία ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ανοσολογική απόκριση συμπεριλαμβανομένης τοπικής ανοσίας στο έντερο.
- ✓ Στο OPV έχουμε την διασπορά των ζωντανών στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα σε άλλα άτομα του στενού περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης.

Χάρης αυτά το OPV επικράτησε έναντι του IPV στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου και βοήθησε στην εξάλειψη της πολιομυελίτιδας από τις περισσότερες χώρες [93]. Το OPV όμως, έχει και ορισμένα μειονεκτήματα:

- ✓ Αρχικά απαιτείται η χρήση του εμβολίου πρώτα σε πιθήκους για δοκιμές ασφαλείας.
- ✓ Αντενδείκνυται για άτομα με ανοσοανεπάρκεια ή ανοσοκαταστολή.
- ✓ Επειδή πρόκειται για ζωντανό ιό υπάρχει η πιθανότητα:
 - Να μεταλλαχθεί σε νευροτοξική μορφή, προκαλώντας εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP)
 - Να οδηγήσει στην εμφάνιση εμβόλιο-προερχόμενων πολιοϊών (VDPV) προκαλώντας εκ νέου ξέσπασμα πολιομυελίτιδας.

VAPP – VDPV

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων ή/και γενετικού ανασυνδυασμού. Πράγματι, νευρομολυσματικά στελέχη που προέρχονται από τα αντίστοιχα Sabin εμβολιακά στελέχη έχουν βρεθεί στο έντερο υγιών εμβολιασμένων ατόμων και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με VAPP. Νευρομολυσματικά στελέχη προερχόμενα από τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις (περίπου το 88% των περιπτώσεων) πιο συχνά σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το στέλεχος PV-1/Sabin. Προφανώς αυτό σχετίζεται με τον μεγαλύτερο αριθμό των μεταλλάξεων που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στο στέλεχος PV-1/Sabin σε σύγκριση με τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη [93].

Ο παθογόνος χαρακτήρας αυτών των νευρομολυσματικών στελεχών σχετίζεται γενικά με δύο ειδών μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στα εμβολιακά στελέχη των πολιοϊών έχει βρεθεί ότι αντιστρέφονται (μέσω μεταλλάξεων στα σημεία που αποτελούν τους καθοριστές του εξασθενημένου φαινοτύπου) ή καταστέλλονται (μέσω μεταλλάξεων σε άλλα σημεία εκτός των καθοριστών του εξασθενημένου φαινοτύπου) σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από VAPP περιπτώσεις [92].

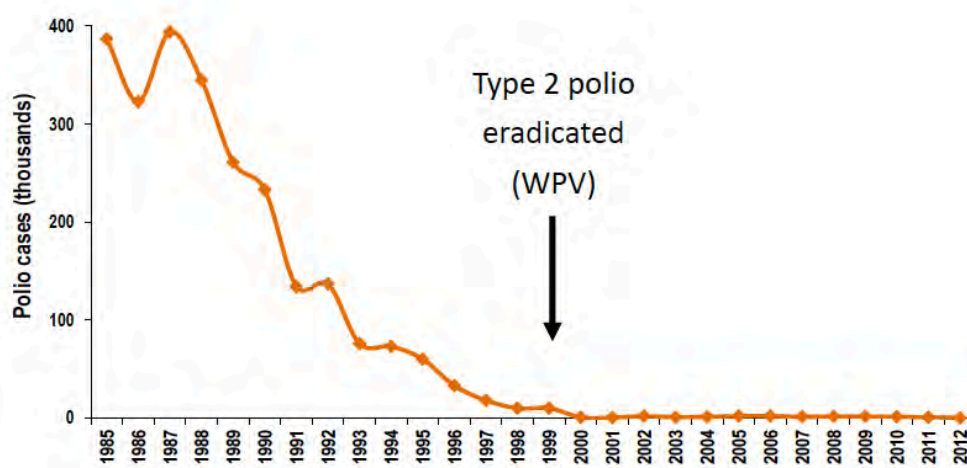
Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης ένα συχνό γεγονός σε άτομα εμβολιασμένα με το OPV οδηγώντας σπάνια σε VAPP. Η ανάλυση VAPP περιπτώσεων παρουσιάζει ανασυνδυασμούς πολιοϊών με μία συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 2 κατά 50% και κατά 67% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 3. Αντίθετα η συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 1 σε ανασυνδυασμούς είναι πιο σπάνια [94]. Πιθανόν ο αιτιολογικός παράγοντας αυτού του φαινομένου είναι ο μικρότερος χρόνος παραμονής στο έντερο των στελεχών Sabin τύπου 1 σε σύγκριση με τα στελέχη Sabin τύπου 2 και τύπου 3. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι ο ανασυνδυασμός είναι κυρίως δια-τυπικός και συμβαίνει:

- ✓ μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin [95,96],
- ✓ μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου [97-98]
- ✓ μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses) [99].

Έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως αλλά όχι πάντα σε εκείνες τις περιοχές του ιικού γενώματος που κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές) [84,95]. Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών (δυσμενή συνθήκη για ομόλογο ανασυνδυασμό) και επιπλέον η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των προδρόμων τους. Έτσι οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών προτιμούν τον ανασυνδυασμό στις περιοχές P2 και P3 οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας [100]. Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1) [101-102-103]. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων στελεχών χαρακτηρίζονται μόνο από μία θέση ανασυνδυασμού, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες έχουν εντοπιστεί πολλαπλά σημεία ανασυνδυασμού [98,104].

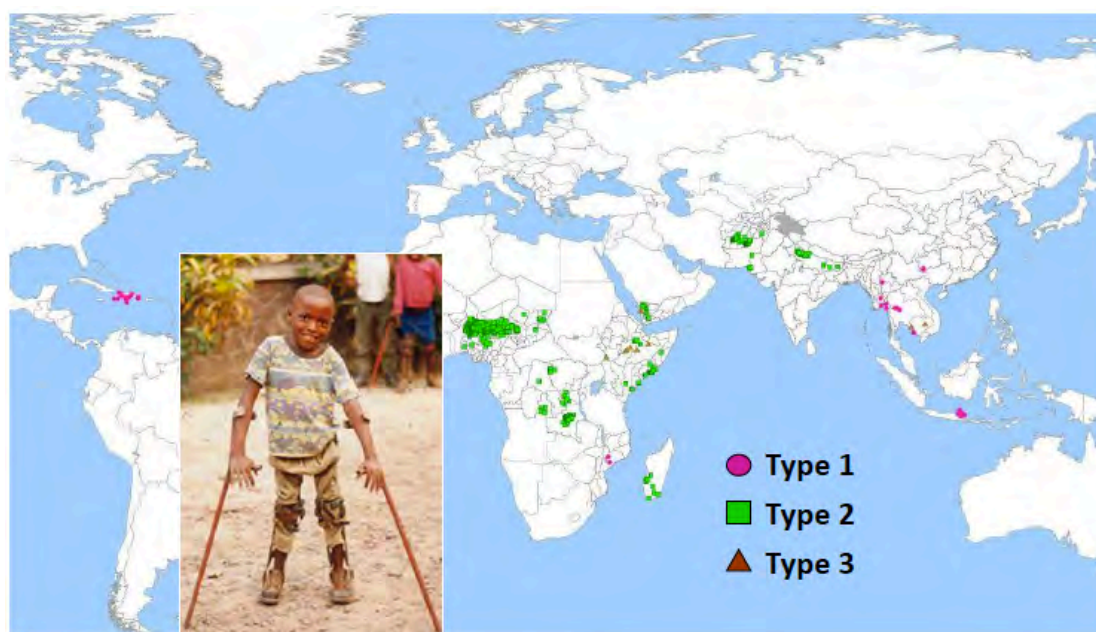
Η απομόνωση στελεχών Sabin με παρόμοιες γενετικές τροποποιήσεις τόσο από περιπτώσεις VAPP όσο και από υγιή εμβολιασμένα άτομα οδήγησε στην άποψη ότι παράγοντες του ξενιστή παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας. Πιθανόν, κάποιοι τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσε να ήταν αυτοί που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με την 5'-NTR περιοχή. Επίσης ως παράγοντες του ξενιστή θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι ανοσοανεπάρκειες (π. χ λόγω μόλυνσης με τον HIV). Επιπλέον ενδομυϊκές ενέσεις μέσα σε

περίοδο 30 ημερών μετά την έκθεση στο OPV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση VAPP περιπτώσεων [92]. Ο συνεχής γενετικός χαρακτηρισμός στελεχών πολιοϊών που απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις και υγιή άτομα ίσως βοηθήσει στην διαλεύκανση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων παραγόντων του ιού και του ξενιστή που είναι σημαντικές για την εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας [92].



Εικόνα1.9.1: Κρούσματα παιδικής παράλυσης απο polio

Η συνεχιζόμενη χρήση του OPV εμβολίου, εκτός από τους κινδύνους που επιφέρει η VAPP, μπορεί να επιφέρει ξέσπασμα εμβολιοπροερχόμενων πολιοϊών (VDPV). Οι VDPV προέρχονται από το OPV, αλλά διαφέρουν από τα στελέχη του OPV και τους πολιοϊούς που απομονώνονται από άτομα έπειτα από εμβολιασμό με OPV, έχοντας περισσότερες του 1%

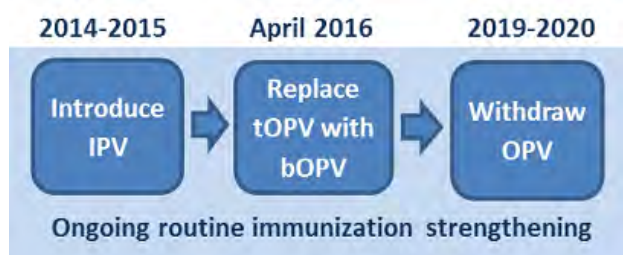


Εικόνα 1.9.2: Κρούσματα VDPV με βάση τον τύπο από τον οποίον προήλθαν μεταξύ 2000-2013

νουκλεοτιδικές αλλαγές στην κωδική περιοχή της VP1. Οι VDPV μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες:

- ✓ Στελέχη VDPV που κυκλοφορούν στο περιβάλλον (cVDPV)
- ✓ VDPV που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV)
- ✓ Αμφιλεγόμενοι VDPV (aVDPV) στους οποίους η πηγή της μόλυνσης είναι άγνωστη.

Λόγο της πολύ μεγάλης εμφάνισης cVDPV από τον Sabin τύπου 2, σε συνδυασμό με την εξαφάνιση του αγρίου στελέχους τύπου 2, έχει ξεκινήσει από τον Απρίλιο του 2016 αντικατάσταση του tOPV που περιέχει και τους 3 τύπους και ήταν το κλασικό εμβόλιο που εχορηγείτο με το bOPV όπου περιέχει μόνο τους τύπους 1 και 3 και θα γίνεται σε συνδυασμό με το IPV. Η κίνηση αυτή γίνεται με σκοπό την αποφυγή περαιτέρω περιπτώσεων πολιομυελίτιδας λόγω του τύπου 2 cVDPV. Έως και το τέλος του 2020 σχεδιάζεται η οριστική απομάκρυνση του OPV από όλο τον κόσμο. [112]



Εικόνα 1.9.3: Το χρονοδιάγραμμα για τον εμβολιασμό κατά της πολιομυελίτιδας από τον WHO.

1.10 Επιδημιολογία

Το πεδίο των πολιοϊών είχε την τύχη να έχει περισσότερα του ενός εξαιρετικά εμβόλια, καθώς ήταν διαθέσιμα τόσο το νεκρό ενδομυϊκό εμβόλιο του Salk όσο και το εξασθενημένο από στόματος εμβόλιο του Sabin. Και τα δύο εμβόλια οδήγησαν στην παραγωγή αντί-PV αντισωμάτων με την επακόλουθη προστασία από τη νόσο [105]. Παρόλο που υπήρχε μια συνεχόμενη προάσπιση του ενός ή του άλλου εμβολίου για αρκετά χρόνια, είναι ξεκάθαρο ότι το καθένα έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Τώρα, που τα κρούσματα πολιομυελίτιδας φθίνουν συνεχώς, έχουν αναπτυχθεί νέες οδηγίες στις ΗΠΑ από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) και την ACIP (Συμβουλευτική Επιτροπή Εφαρμογών Ανοσοποίησης), με μια στροφή από το στοματικό εμβόλιο (OPV) στην αποκλειστική χρήση του ενδομυϊκού εμβολίου (IPV) (σε ηλικία 2 μηνών, 4 μηνών, 6 έως 18 μηνών και 4 έως 6 χρονών). Το κύριο αναμενόμενο όφελος της αλλαγής αυτής ήταν η εξάλειψη της VAPP και μελέτες στη συνέχεια απέδειξαν ότι αυτό ήταν επιτυχές [106].

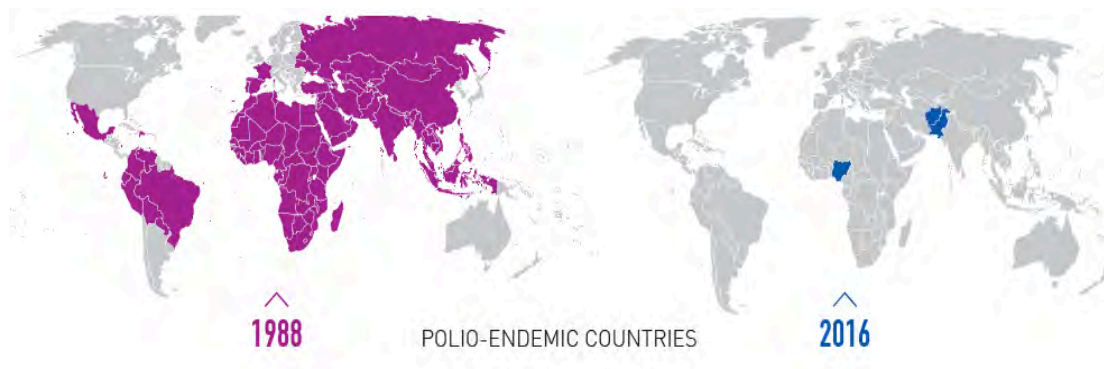
Το πρόγραμμα εμβολιασμού κατά των πολιοϊών αποδείχθηκε επιτυχημένο. Ως αποτέλεσμα της χρήσης του OPV, δεν προέκυψε κανένα περιστατικό παραλυτικής πολιομυελίτιδας από αγρίου τύπου πολιομυελίτιδα από το 1980 στις ΗΠΑ ή σε ολόκληρη την Αμερική από το 1991, θέτοντας έτσι ένα θεωρητικό και πρακτικό πλαίσιο για την παγκόσμια εξάλειψη του πολιοϊού. Η απόλυτη εξάλειψη του πολιοϊού φαίνεται αληθοφανής με δεδομένο τις βιολογικές ιδιότητες και τη διαθεσιμότητα δραστικών εμβολίων. Η επιβίωση του πολιοϊού εξαρτάται από τη συνεχή επαφή για τη μεταφορά του από άτομο σε άτομο, καθώς δεν υπάρχουν μη ανθρώπινες δεξαμενές και ο ιός αντέχει για ένα σχετικά μικρό χρόνο στο περιβάλλον. Οι εμβολιασμοί ρουτίνας με OPV ή με IPV στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες ήταν επιτυχής στην εξουδετέρωση της τοπικής κυκλοφορίας του ιού. Όμως πολλές αναπτυσσόμενες χώρες παρέμεναν ενδημικές επί δεκαετίες μετά την εισαγωγή των εμβολίων κατά των πολιοϊών. Λίγο περισσότερο από δύο δεκαετίες μετά την διαθεσιμότητα του OPV, επιχειρήθηκε η εξάλειψη της νόσου, ξεκινώντας από την Αμερική [107].

Το 1988, ο ΠΟΥ, βασιζόμενος εν μέρει στην ταχεία πρόοδο των ενεργειών της εξάλειψης στην Αμερική, εξέδωσε ένα ψήφισμα για την παγκόσμια εξάλειψη του πολιοϊού πριν το τέλος του 20^{ου} αιώνα. Το ψήφισμα αυτό επιβεβαιώθηκε το Μάιο του 1999 και του 2004 και παροτρύνθηκε μια επιτάχυνση των ενεργειών με συγκεκριμένη εστίαση στις απομείναντες ενδημικές περιοχές. Οι ενέργειες αυτές περιλαμβάνουν επιπρόσθετες περιοδείες της Εθνικής Ημέρας Εμβολιασμού, εκτεταμένη επιτήρηση στις κοινωνίες υψηλού κινδύνου και «ξεκαθάρισμα» των εστιακών δεξαμενών.

Τα στοιχεία αυτά της στρατηγικής εξάλειψης των PVs αποδείχθηκαν επιτυχημένα σε πολλά σημεία του κόσμου. Από τη στιγμή που ξεκίνησε το πρόγραμμα, πολλές χώρες απαλλάχθηκαν από την κυκλοφορία εντόπιων PVs. Αυτό φαίνεται από την εικόνα 1.10.1, όπου το 1988 ο PV βρισκόταν σε όλες τις ηπείρους (εκτός από την Αυστραλία), με εκτιμήσεις για πάνω από 350.000 περιστατικά κάθε χρόνο, ενώ το 2016 ο αριθμός των χωρών με αποδεδειγμένα ή εκτιμώμενα κρούσματα πολιοϊών ήταν μόνο 3 και η Αμερική, Ευρώπη και η Άπω Ανατολή ήταν πιστοποιημένα απαλλαγμένες από PVs [108]. Το 2003, οι μόνες έξι χώρες με ενδημικά περιστατικά PV βρίσκονταν στην Νότια Ασία (Ινδία, Πακιστάν και Αφγανιστάν), Αφρική (Νιγηρία, Νίγηρας και Αίγυπτος). Ως αποτέλεσμα της αδιαφορίας πολλών χωρών και της αναστολής των εμβολιασμών στις βόρειες περιοχές της Νιγηρίας από το 2003 έως το 2005, ένας μοναδικός γενότυπος του πολιοϊού τύπου 1 εξαπλώθηκε σε 18 χώρες της δυτικής, κεντρικής και ανατολικής Αφρικής, στη Μέση Ανατολή ακόμα και την Ινδονησία. Σε αρκετές από αυτές τις χώρες, η μετάδοση του ιού συνεχίστηκε για περισσότερο

από 6 μήνες, κάτι που σήμαινε ότι η κυκλοφορία των PVs ανασυστάθηκε. Έτσι εντάθηκαν οι ενέργειες ελέγχου της περαιτέρω εξάπλωσης και εξάλειψης του ιού σε αυτές τις περιοχές που άλλοτε ήταν απαλλαγμένες από πολιοϊούς [109].

Σήμερα τα κρούσματα πολιομυελίτιδας έχουν περιοριστεί σε 3 μόνο ενδημικές



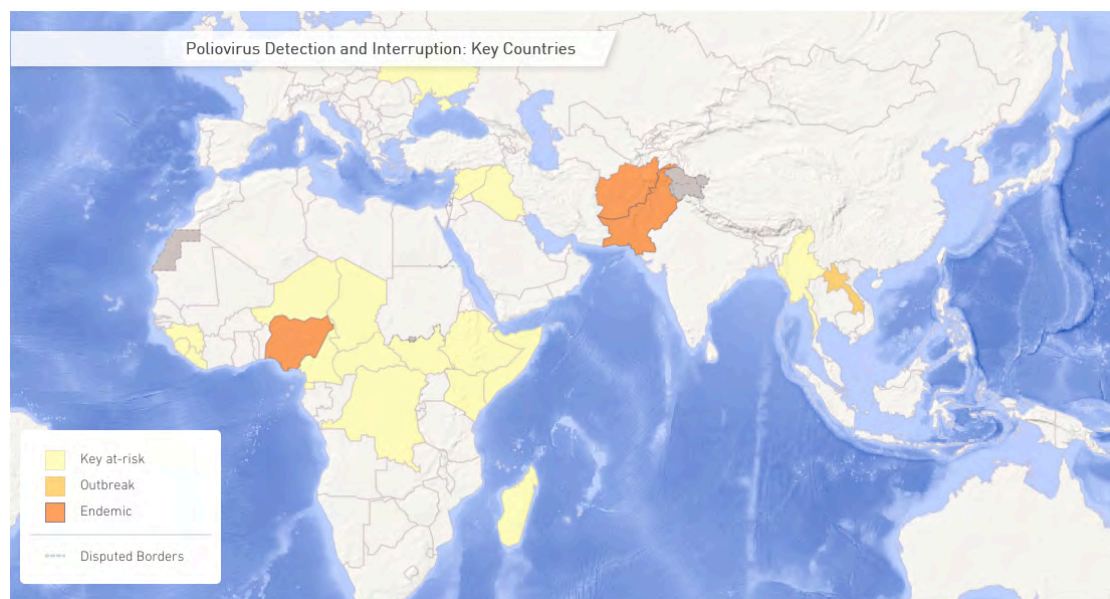
Εικόνα 1.10.1: Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει τις χώρες που ήταν ενδημικές για πολιομυελίτιδα το 1988 και το 2016

χώρες ενώ άλλες 18 χώρες είναι χώρες υψηλού κινδύνου χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν κρούσματα [110,111]. Οι 3 ενδημικές χώρες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τα αντίστοιχα κρούσματα.

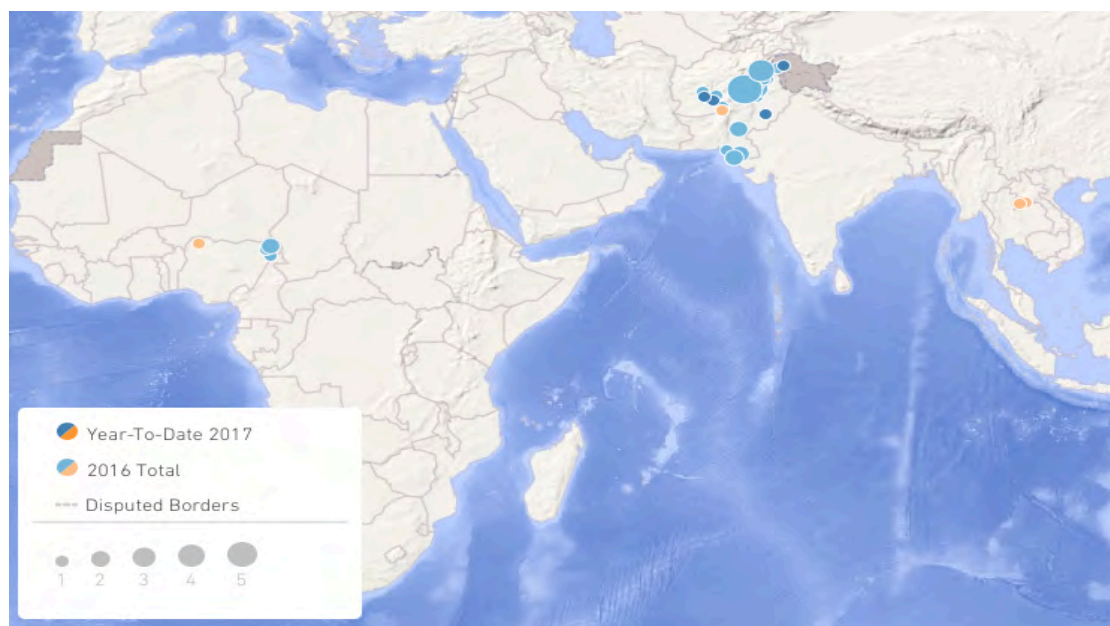
Χώρα	κρούσματα το 2016	κρούσματα από 1/1/17 έως 19/03/17
Αφγανιστάν	13	2
Νιγηρία	4	0
Πακιστάν	20	2

Πίνακας 1.10.1: Κρούσματα πολιομυελίτιδας (τύπου 1) στις 3 ενδημικές χώρες.

Οι χώρες που είναι υπό αυξημένη επικινδυνότητα για το 2017 χωρίς κρούσματα ωστόσο (με δεδομένα έως και 19/3/17) είναι οι χώρες: Καμερούν, Κεντροαφρικανική Δημοκρατία, Τσαντ, Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, Δημοκρατία της Ισημερινής Γουινέας, Αιθιοπία, Γουινέα, Ιράκ, Κένυα, Λιβερία, Μαδαγασκάρη, Μυανμάρ, Νίγηρας, Σιέρα Λεόνε, Σομαλία, Νότιο Σουδάν, Συρία, Ουκρανία. Η χώρα Λάος στην Ασία εμφάνισε τον Ιανουάριο του 2016, 3 κρούσματα cVDPV1 και το 2015, 8 κρούσματα [110,111].



Εικόνα 1.10.2: Οι 3 ενδημικές χώρες (πορτοκαλί), η περίπτωση του Λάος (ανοιχτό πορτοκαλί), και οι 18 χώρες με υψηλή επικινδυνότητα (κίτρινο).



Εικόνα 1.10.3: Τα κρούσματα από 1/1/16 έως 19/3/17. Με κίτρινο φαίνονται τα κρούσματα από cVDPV ενώ με μπλε τα κρούσματα από WPV.

2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η χρήση ειδικών ζευγών εκκινητών για την ανίχνευση πιθανών ανασυνδυασμών που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα των ιών Sabin 1 και Coxsackie A13. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί προκλήθηκαν *in vitro* μετά από συμμόλυνση των ανωτέρω ιικών στελεχών σε κύτταρα Rd. Έτσι εκτελέστηκαν PCR αντιδράσεις χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ζεύγη για την ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων. Ακολούθησε αλληλούχιση των προϊόντων και επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής για την ανάλυση των ανασυνδυασμών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρότυπα στελέχη

Στο πειραματικό μέρος αυτής της πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω 2 στελέχη που ανήκουν στην ομάδα EV-C:

Ορότυπος	Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης
CAV 13	Flores	AF303040
Sabin 1	LSc, 2ab	V01150

Πίνακας 3.1: Πρότυπα στελέχη εντεροϊών. Παρουσιάζονται ο ορότυπος τους, το στέλεχος και ο αριθμός καταχώρησης στην βάση GenBank.

3.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την καλλιέργεια και την απομόνωση των ιών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Rd (Rhabdomyosarcoma). Οι διαδικασίες καλλιέργειας και απομόνωσης ιών πραγματοποιήθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες, σε ειδικές συσκευές καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας 2, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα υλικά (υγρά αντιδραστήρια, γυάλινα και πλαστικά σκεύη).

Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο ανάπτυξης (Growth Medium, GM), το οποίο περιείχε υψηλή περιεκτικότητα σε βόειο ορό (10%), επάγοντας τη γρήγορη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο διατήρησης (Maintenance Medium, MM), το οποίο περιείχε μια μέση περιεκτικότητα σε ορό (2-5%), διατηρώντας έτσι μια αργή ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια του ιικού πολλαπλασιασμού.

Η κυτταρική σειρά φυλάσσεται στους -80°C παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος DMSO σε ειδικά φιαλίδια. Κατά τη διαδικασία της απόψυξης το φιαλίδιο μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το φιαλίδιο φυγοκεντρήθηκε για 3 min στις 8.000rpm, το υπερκείμενο που περιείχε DMSO απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 2ml GM. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιεργειών 25cc, προστέθηκαν 5ml GM και η φιάλη τοποθετήθηκε στους 37°C για να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Τα κύτταρα στη συνέχεια εξετάζονταν καθημερινά με παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο διέλευσης φωτός, για να διαπιστωθεί τόσο η ποιότητά τους όσο και η κάλυψη της επιφάνειας της πλαστικής φιάλης κυτταροκαλλιιεργειών. Όταν η κάλυψη των κυττάρων ήταν περίπου στο 90% της επιφάνειας της φιάλης, τότε ακολουθούσε ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων, κατά τον οποίο αρχικά απομακρύνονταν το θρεπτικό μέσο, και ακολουθούσαν δυο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα θρυψίνης – EDTA με επώαση για 2 min στους 37°C για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης. Στη συνέχεια τα αποκολλημένα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 21ml μέσου GM με ταυτόχρονη ανάδευση με πιπέτα έτσι ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων. Τέλος το εναιώρημα των κυττάρων μοιραζόταν σε τρεις πλαστικές φιάλες και τοποθετούταν στους 37°C, έως ότου χρειαζόταν εκ νέου αναδιπλασιασμός.

Διαλύματα:

Growth Medium (GM):

- ✓ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) (Biosera, France), 1M HEPES (Merck, Germany), 1X Antibiotic – Antimycotic (Biosera, France) το οποίο περιέχει πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και αμφοτερικίνη B, 1X Non-essential amino acids (Biosera, France) και 10% Fetal Bovine Serum (Biosera, France).

Maintenance Medium (MM):

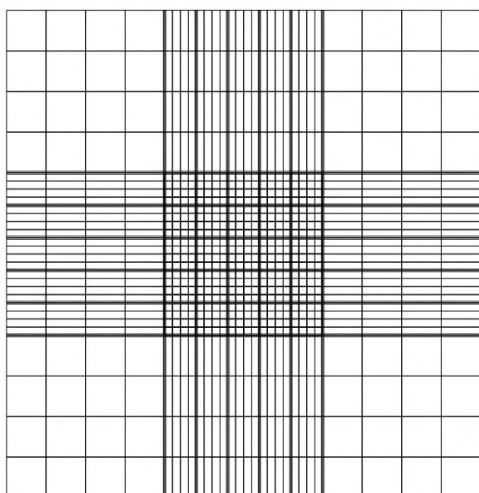
- ✓ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) (Biosera, France), 1M HEPES (Merck, Germany), 1X Antibiotic – Antimycotic (Biosera, France), 1X Non-essential amino acids (Biosera, France) και 5% Fetal Bovine Serum (Biosera, France)

Διάλυμα Θρυψίνης – EDTA:

- ✓ Hank's Balanced Salt Solution (Biosera, France) και 1X Trypsin – EDTA (Biosera, France)

3.3 Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του MOI (Multiplicity of Infection) που θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω. Η μέτρηση αφορούσε τον αριθμό των Rd κυττάρων που περιέχονταν σε πλάκα κυτταροκαλλιιεργειών 24 θέσεων. Αρχικά προστέθηκε 1ml εναιωρήματος κυτταροκαλλιιεργειας σε θρεπτικό μέσο GM σε κάθε θέση της πλάκας και ακολούθησε



Εικόνα 3.3: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Οι τέσσερις γωνίες είναι οι θέσεις στις οποίες γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονταν σε όλες τις υπόλοιπες θέσεις, καθώς επίσης και πάνω στις γραμμές δεν μετρούνται.

επώαση στους 37°C για 24 h για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας από τα Rd κύτταρα. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 0.5ml διαλύματος θρυψίνης – EDTA εις διπλούν για την αποκόλληση των κυττάρων. Έπειτα, προστέθηκε 1ml θρεπτικού υλικού D-MEM απουσία ορού με ταυτόχρονη ανάδευση για την διάσπαση τυχόν συσσωμάτων. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 0.2ml εναιωρήματος κυττάρων και 0.2ml διαλύματος Trypan Blue (0.1% w/v) σε σωλήνα eppendorf (2ml) και αναμείχθηκαν με πιπेटάρισμα. Χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur μεταφέρθηκε αρκετή ποσότητα του μίγματος στην εγκοπή του αιμοκυτταρόμετρου

Neubauer, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο για την παρατήρηση και καταγραφή των ζωντανών κυττάρων. Λόγω του διαλύματος Trypan Blue τα νεκρά κύτταρα βάφονται μπλε, οπότε μετρήθηκαν μόνο τα λευκά κύτταρα και μόνο όσα βρίσκονταν στις τέσσερις γωνίες του αιμοκυτταρόμετρου (εικόνα 2.3.2.1). Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ανά ml έγινε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$C = tcn \times df \times 0.25 \times 10^4$$

Όπου:

tcn: ο συνολικός αριθμός των κυττάρων

df: ο συντελεστής αραιώσης του διαλύματος που μελετήθηκε

3.4 Μέτρηση του ιικού τίτλου των δειγμάτων

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για τα Sabin 1 και CAV 13. Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (εικόνα 3.4) προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση και ακολούθησε επώαση για 24 h στους 37°C. Στη συνέχεια, για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁶. Σε κάθε πλάκα

μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος 2 διαφορετικών ιικών στελεχών. Έπειτα, 400μl της 10^{-1} αραιώσης του πρώτου ιικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B2-B5 (100μl / θέση), ενώ 400μl της 10^{-1} αραιώσης του δεύτερου ιικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B6-B9 (100μl / θέση). Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι και τον

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M

Εικόνα 3.4: Πλάκα μικροτιτλοποίησης.

ενοφθαλμισμό της 10^{-6} αραιώσης στην πλάκα. Στις στήλες 10 και 11 δεν προστέθηκε ιικό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C και η παρακολούθησή της για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκεσε 5 μέρες. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

$$\log\text{CCID}_{50} = L - d(S - 0.5)$$

Όπου:

CCID: Cell Culture Infective Dose

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Στις PCR που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν φθίνουσες συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος με σκοπό να μετρηθεί και η ευαισθησία της κάθε PCR δοκιμασίας. Για το λόγο αυτό έγιναν σειριακές αραιώσεις του κάθε δείγματος έτσι ώστε κάθε δείγμα να υπάρχει σε συγκεντρώσεις των τιμών από 10^5 έως και 1 CCID₅₀/0,1ml.

Real-Time PCR για τον υπολογισμό του ιικού τίτλου του στελέχους CAV13

Ο υπολογισμός του ιικού τίτλου γίνεται, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, με βάση τη μέτρηση του CCID₅₀. Στην περίπτωση των CAV ιών και συγκεκριμένα του στελέχους CAV13 η παραπάνω διαδικασία δεν ήταν δυνατή καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος δεν προκαλούσε CPE. Έτσι σχεδιάστηκε μια Real-Time PCR για τον υπολογισμό του ιικού τίτλου του CAV13 με βάση δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων του στελέχους Sabin 1.

Αρχικά δημιουργήθηκαν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του στελέχους Sabin 1 δημιουργώντας δείγματα ιικού τίτλου από 105 έως και 1 CCID₅₀. Τα δείγματα αυτά αφού

εκχυλίστηκαν και συντέθηκε το cDNA, υποβλήθηκαν παράλληλα με το υπό μελέτη δείγμα CAV13 σε Real-Time PCR χρησιμοποιώντας το εκκινητικό ζεύγος UG52 / UC53.

Δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιείχε: 1X ROX Low (Kapa Biosystems, USA), 1X KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix (Kapa Biosystems, USA), 5pmol από τον κάθε εκκινητή και ddH₂O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστέθηκε σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις παρακάτω συνθήκες:

1 ^{ος} κύκλος	-1 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-3 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 ^{ος} κύκλος	- Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

3.5 Ταυτόχρονη μόλυνση κυττάρων με Sabin1 και CAV13

Η μόλυνση των Rd κυττάρων με στελέχη Sabin 1 και CAV13 ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη παραγωγή *in vitro* ανασυνδυασμένων στελεχών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε πλαστική πλάκα κυτταροκαλλιέργειών 24 θέσεων στην οποία προστέθηκε αρχικά 1ml εναιωρήματος Rd κυττάρων σε θρεπτικό μέσω MM και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 h για την κάλυψη της επιφάνειας από τα κύτταρα. Στη συνέχεια, αφού παρατηρήθηκαν τα κύτταρα ως προς την ποσότητα και την ποιότητα προστέθηκαν τα δύο στελέχη με τον ανάλογο ιικό τίτλο έτσι ώστε να επιτευχθεί MOI (Multiplicity of Infection) = 10. Ο τύπος μέσω του οποίου προσδιορίζεται το MOI έχει ως εξής:

$$MOI = \frac{CCID_{50}}{\text{Αριθμός Κυττάρων}}$$

Μέσω του τύπου αυτού υπολογίστηκε ο επιθυμητός ιικός τίτλος των δύο στελεχών και υπολογίστηκε η ποσότητα που έπρεπε να προστεθεί στην κυτταροκαλλιέργεια. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον θέσεις στη πλάκα ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες της μόλυνσης. Στους θετικούς μάρτυρες είχαν προστεθεί Sabin 1 και CAV13 σε διαφορετικές θέσεις με MOI=10 και στους αρνητικούς προστέθηκε μόνο θρεπτικό μέσο απουσία ορού. Μετά την μόλυνση των κυττάρων ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h

και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1ml νέου θρεπτικού MM και η πλάκα τοποθετήθηκε στους 37°C για 24 h. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομάκρυνση των ιών που δεν είχαν εισέλθει στα κύτταρα στο χρονικό διάστημα της μιας ώρας. Μετά το πέρας των 24 h τα κύτταρα της πλάκας παρατηρήθηκαν στο ανάστροφο μικροσκόπιο, όπου εντοπίστηκε πλήρης καταστροφή των κυττάρων (4⁺ CPE) τόσο στους θετικούς μάρτυρες, όσο και στην υπό μελέτη θέση. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε αλλοίωση των κυττάρων.

Το υλικό (1ml) της μόλυνσης κυττάρων της υπό μελέτης θέσης συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε 10 θέσεις (100μl / θέση) μικροπλάκας 96 θέσεων στην οποία είχαν τοποθετηθεί κύτταρα Rd σε θρεπτικό MM. Ακολούθησε επώαση της μικροπλάκας στους 37°C για 24 h και το υλικό της κυτταροκαλλιέργειας συλλέχθηκε και από τις 10 θέσεις και τοποθετήθηκε στου -20°C για περαιτέρω μελέτη. Μέσω της διαδικασίας αυτής δημιουργήθηκαν 10 διαιρέσεις (aliquots) του αρχικού δείγματος που είχε προκύψει έπειτα από την ταυτόχρονη μόλυνση με Sabin 1 και CAV13. Τα 10 aliquots διαιρούν το αρχικό δείγμα και επιτρέπουν την καλύτερη μελέτη των πολλών και διαφορετικών ανασυνδυασμών που μπορεί να προκύψουν, σε σχέση με τη μελέτη ενός δείγματος όπου θα εντοπιζονταν μόνο ο επικρατέστερος ανασυνδυασμός εις βάρος των υπολοίπων πιθανών ανασυνδυασμών.

3.6 Εκχύλιση του ιικού RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [135]. Συγκεκριμένα, σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από το υλικό της ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) του μίγματος και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 min στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στα 14000rcf και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 min στα 14000rcf. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου ύδατος (ddH₂O). Τα erpendorf παρέμειναν στους -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

3.7 Σχεδιασμός εκκινητών για την ανίχνευση ανασυνδυασμών

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Θέση	Πολικότητα
CAV673S	GGATTCACTCCATTGAACACA	673 – 693	Sense
SAB781S	CGAGAATTCTAACCGAGCCTA	781 – 801	Sense
SAB2366S1	CCTCTTTCGACACCCAGAGA	2366 – 2385	Sense
CAV2517A	GCGTTAGACGCAACTTGTGTGA	2517 – 2538	Antisense
CAV2519S	TTACAATTGTCCCAGCCAAC	2519 – 2538	Sense
SAB2596A	CTTGGAGTGTGCTGGTCCAC	2596 – 2615	Antisense
SAB3466S	GCAAAACGCAGTGAACGTC	3466 – 3484	Sense
CAV3521A	GATCACGCTCCACATACTT	3521 – 3540	Antisense
CAV3840S	CCATGGAACAGGGTATCACTTC	3840 – 3861	Sense
SAB3950A	GCTTTTCAGTGATGGTACTGG	3950 – 3970	Antisense
SAB4113S1	TCACCAAGCAAGGTGACAG	4113 – 4131	Sense
CAV4153A	CCAAGAATCACCTTGTTCAT	4153 – 4173	Antisense
CAV5020S	GGACAAGTACTCCAGGCAGA	5020 – 5039	Sense
SAB5207A	CCTCCTGGGAGTCAACTGCT	5207 – 5226	Antisense
CAV5519A	TGCTGGTGGTGGCAGTAGTT	5519 – 5538	Antisense
SAB5527S	CCACGACAACGTGGCTATTT	5527 – 5546	Sense
CAV6637A	ACCAACTGCACTACCAGTGAC	6637 – 6656	Antisense
SAB6754A1	GATTTTCTCAAGCACCATCTCT	6754 – 6773	Antisense

Πίνακας 3.7: Εκκινητές για την ανίχνευση ανασυνδυασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13. Η θέση των εκκινητών πάνω στο γονιδίωμα βασίζεται στο πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 για τους εκκινητές με αρχικά SAB και στο πρότυπο στέλεχος CAV13 για τους εκκινητές με αρχικά CAV.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση διαφόρων τμημάτων. Ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μέσω του προγράμματος Primer3 Plus [136] και με βάση τα εξής γενικά κριτήρια:

- ✓ Μήκος εκκινητών από 20 έως 22 βάσεις
- ✓ Σημείο τήξης (Tm) από 57°C έως 63°C
- ✓ Ποσοστό σε GC από 50% έως 60%

Από τα ζεύγη εκκινητών που προέκυψαν, επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκείνα που εμφάνιζαν τη μικρότερη συμπληρωματικότητα τόσο στα άκρα όσο και σε ολόκληρο το μήκος τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών μεταξύ των εκκινητών και δομών φουρκέτας, φαινόμενο που παρεμποδίζει τη διαδικασία της PCR.

Όλοι οι εκκινητές που αναλύονται παρακάτω κατασκευάστηκαν από την εταιρία Macrogen (South Korea).

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί ανά ζεύγος ο sense σε Sabin 1 αλληλουχία και ο antisense σε CAV 13 αλληλουχία και αντίστροφα.

3.8 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία από το RNA συντίθεται ένα cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Για όλες τις PCR που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με χρήση τυχαίων εκκινητών. Πρόκειται για μίγμα επτανουκλεοτιδίων με τυχαία αλληλουχία που υβριδίζεται σε πολλές θέσεις πάνω στο γονιδίωμα του ιού παράγοντας έτσι ένα μίγμα από cDNAs μετά το πέρας της αντίδρασης που καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό του ιικού γονιδιώματος.

Αρχικά προετοιμάστηκε το πρώτο μίγμα το οποίο περιέχει 100pmol τυχαίους εκκινητές (random primers) d(N7) (Macrogen), 2mM dNTPs και ddH₂O μέχρι τα 5μl. Σε erppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl / tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε επώαση των erppendorf στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή Erppendorf – Mastercycler για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA. Μετά την επώαση, τα erppendorf τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα το οποίο περιείχε 1X First strand Buffer, 0.01M Dithiothreitol, 10 Units RNase out, 100 Units M-MLV (Invitrogen) και ddH₂O έως τα 8μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε erppendorf και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 min στους 25°C για τον υβριδισμό των εκκινητών, 50 min στους 37°C για τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

3.9 PCR για την ανίχνευση ανασυνδυασμών

Για την ανίχνευση των πιθανών ανασυνδυασμών που είχαν προκύψει έπειτα από την ταυτόχρονη μόλυνση των Rd κυττάρων με Sabin1 και CAV13 εφαρμόστηκαν στα 10 aliquots που προέκυψαν εννέα διαφορετικές PCR αντιδράσεις.

Το μίγμα της κάθε αντίδρασης περιείχε: 1mM dNTPs, 1X Kara Taq Buffer, 2mM MgCl₂, 25pmol από κάθε εκκινητή, 2U Kara Taq και ddH₂O μέχρι τα 47μl. Στο μίγμα αυτό προστέθηκαν 3μl από το cDNA και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε Eppendorf – Mastercycler θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

1 κύκλο	2 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
	30 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA
40 κύκλους	30 sec στις αντίστοιχες θερμοκρασίες που αναγράφονται στον πίνακα 2.9.2.1 για τον υβριδισμό των εκκινητών
	2 min στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 min στους 72°C για την πλήρη σύνθεση των ημιτελών κλώνων

Πίνακας 3.9.1: Συνθήκες PCR.

	Ζεύγος εκκινητών	Μήκος Προϊόντος	Περιοχή υπό μελέτη	Θερμοκρασία υβριδισμού
1	CAV673S SAB2596A	1900bp	5'-UTR – VP1	55°C
2	CAV2519S SAB3950A	1430bp	VP1 – 2B	53°C
3	CAV3840S SAB5207A	1370bp	2B – 3A	57°C
4	CAV5020S SAB6754A1	1730bp	2C – 3D	55°C
5	SAB781S CAV2517A	1740 bp	VP4 – VP1	51°C
6	SAB2366S1 CAV3521A	1155bp	VP3 – 2A	54°C
7	SAB3466S CAV4153A	690bp	2A – 2C	53°C
8	SAB4113S1 CAV5519A	1400bp	2B – 3C	55°C
9	SAB5527S CAV6637A	1110bp	3C – 3D	63°C

Πίνακας 3.9.2: Τα ζεύγη εκκινητών που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση ανασυνδυασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13. Παρουσιάζονται το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος ενίσχυσης, η γενωμική περιοχή που ενισχύεται καθώς και η θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόστηκε για κάθε ζεύγος.

Επειδή το κάθε εκκινητικό ζεύγος παρουσιάζει διαφορετικό T_m είναι αναμενόμενο να εφαρμόζεται διαφορετική θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε ζεύγος. Η τελική θερμοκρασία υβριδισμού είναι η θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη δυνατή εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Δηλαδή, να ενισχύονται τμήματα μόνο από ανασυνδυασμένα στελέχη, χωρίς να ενισχύονται τα πρότυπα που δεν φέρουν ανασυνδυασμούς. Έτσι έπειτα από αρκετές PCR αντιδράσεις για κάθε εκκινητικό ζεύγος προέκυψαν οι παραπάνω θερμοκρασίες υβριδισμού.

3.10 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αгарόζης με συγκέντρωση που κυμαινόταν από 1.5 έως 2%, ανάλογα με το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων της κάθε ηλεκτροφόρησης. Για προϊόντα μήκους μεγαλύτερου των 1000bp χρησιμοποιούνταν η συγκέντρωση 1.5% ενώ για προϊόντα μήκους μικρότερου των 1000bp η συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, αντίστοιχη ποσότητα αгарόζης (0.9gr ή 1.2gr) (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αгарόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου ($EtBr_2$) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 $\mu g/ml$. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αгарόζης, 10 μl PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 μl 10X Gel Loading Buffer (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40%w/v και TBE) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) για τα προϊόντα μήκος μέχρι 1000bp και ο 1000bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) για τα προϊόντα μήκους μεγαλύτερου των 1000bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αгарόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε χρησιμοποιώντας ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

3.11 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Για τα προϊόντα της PCR που θα ακολουθούσε αλληλούχηση, το πρώτο βήμα πριν την κλωνοποίηση και αλληλούχηση τους αποτελούσε ο καθαρισμός του προϊόντος από το πήκτωμα αγαρόζης. Συγκεκριμένα, σε νέα ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης φορτώθηκαν τα υπόλοιπα 40μl των προϊόντων της PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες erpendorf των 1.5ml. Ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη βοήθεια του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και προέκυψαν στο τέλος του καθαρισμού 20μl του καθαρισμένου προϊόντος.

3.12 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR

Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της PCR, είναι τα εξής: η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, η επιλογή των κατάλληλων κλώνων μέσω Colony-PCR και τέλος η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με ένζυμο περιορισμού EcoRI.

Αντίδραση τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning)

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.0- TOPO (Life Technologies, USA), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελούταν από 1μl φορέα pCR 2.0-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων E.Coli στελέχους JM109 σε σωληνάρια erpendorf των 2ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 30 min. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων μέσω της διαδικασίας “heat shock”, κατά την οποία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 42°C για 90 sec και ακολούθως τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 min.

800μl θρεπτικού υποστρώματος LB Broth (Scharlau, Spain) προστέθηκαν στα προϊόντα του “heat shock” και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h με ανάδευση στις 180 στροφές/min. Έπειτα, έγινε επίστρωση 150μl καλλιέργειας σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar (Scharlau, Spain) εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη (Calbiochem-Merck, Germany) και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA).

Ακολούθησε ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Αφού αναπτύχθηκαν οι αποικίες, συλλέχθηκαν 2 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια errendorf των 0.2ml που περιέχονταν 15μl ddH₂O. Από το ελαιώρημα αυτό τα 3μl μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια errendorf για την εκτέλεση Colony-PCR που θα αναλυθεί παρακάτω, ενώ τα υπόλοιπα 12μl μεταφέρθηκαν σε σωλήνες των 15ml (Corning, USA) που περιείχαν 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη.

Οι θετικές αποικίες που προέκυψαν από την Colony-PCR επωάστηκαν ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/min.

Colony-PCR

Μέσω της Colony-PCR, μιας παραλλαγής της κλασσικής PCR έτσι ώστε να είναι δυνατή η απευθείας διεξαγωγή της σε βακτηριακό ελαιώρημα, επιτυγχάνεται η επιλογή των κατάλληλων αποικιών έπειτα από την κλωνοποίηση. Ως κατάλληλες ορίζονται οι αποικίες εκείνες που φέρουν το σωστό ένθεμα στο πλασμίδιό τους. Στην Colony-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του προϊόντος που μελετάται και εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης που εφαρμόστηκαν στην αντίστοιχη PCR.

Αρχικά τα 3μl του ελαιωρήματος της βακτηριακής αποικίας, που είχαν προστεθεί σε μικροσωληνάρια στο προηγούμενο βήμα, τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Errendorf – Mastercycler και επωάστηκαν στους 95°C για 10 min με σκοπό τη λύση των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση του πλασμιδίου. Στη συνέχεια τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκαν 22μl μίγματος που περιείχε τα παρακάτω: 1mM dNTPs, 1X Kara Taq Buffer, 2mM MgCl₂, 12.5pmol από τον κάθε εκκινητή, 1U Kara Taq και ddH₂O μέχρι τα 22μl. Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν εκ νέου στον θερμοκυκλοποιητή και εφαρμόστηκαν οι αντίστοιχες συνθήκες με εκείνες που εφαρμόστηκαν κατά την PCR.

Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με RFLP

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες με τη χρήση του Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπου 2ml της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση 50μl πλασμιδιακού DNA.

Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού EcoRI μέσω της τεχνικής RFLP για την επαλήθευση της ενσωμάτωσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα πριν την αποστολή των δειγμάτων για αλληλούχηση. Ο φορέας κλωνοποίησης φέρει δυο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου EcoRI εκατέρωθεν του σημείου ένθεσης. Έτσι ένα θετικό αποτέλεσμα της RFLP στο πλασμίδιο (δίκλωνο κυκλικό DNA), περιλαμβάνει 2 διαφορετικές ζώνες (ή περισσότερες στην περίπτωση που η θέση αναγνώρισης υπάρχει και στο ένθεμα).

Σε μικροσωληνάρια των 500μl τοποθετήθηκαν τα παρακάτω: 2μl πλασμιδιακό DNA, 1X Buffer, 10U EcoRI και ddH₂O μέχρι τα 20μl. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h. Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη 5μl 10X Loading Buffer και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 2%, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Τα δείγματα που ήταν θετικά έπειτα από την διαδικασία της πέψης στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρία MacroGen Europe (The Netherlands).

3.13 Επεξεργασία αλληλουχιών

Καθαρισμός και διόρθωση των αλληλουχιών

Στην περίπτωση της αλληλούχησης πλασμιδιακού φορέα, η αλληλουχία που προκύπτει περιλαμβάνει, εκτός από την αλληλουχία του ενθέματος και πλασμιδιακές αλληλουχίες, καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται κατά την αλληλούχηση στοχεύουν σε πλασμιδιακές θέσεις εκατέρωθεν του σημείου ένθεσης. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα επεξεργασίας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GeneRunner (www.generunner.net) πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση των πλασμιδιακών αλληλουχιών.

Επιπλέον, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δυο αναγνώσεις κατά την αλληλούχηση, μια για κάθε κλώνο, ιδιαίτερα για τα δείγματα μεγάλου μήκους. Οι δυο αυτές

αναγνώσεις, χρησιμοποιώντας το παραπάνω πρόγραμμα, μελετήθηκαν, συγκρίθηκαν και διορθώθηκαν τυχόν λάθη στις αλληλουχίες.

Στοίχιση των αλληλουχιών

Για τη στοίχιση των αλληλουχιών και τη δημιουργία των απαραίτητων αρχείων στοίχισης για την ανάλυση ανασυνδυασμών που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA7 [113].

Ανάλυση ανασυνδυασμών

Η ανίχνευση και μελέτη των ανασυνδυασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13 στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ανάλυσης ανασυνδυασμών SimPlot (RaySoft v3.2) [114]. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί τη μέθοδο της νουκλεοτιδικής απόστασης δυο ή περισσότερων αλληλουχιών (distance-based method) για την ανίχνευση ανασυνδυασμών στο υπό μελέτη δείγμα. Η στοίχιση της άγνωστης αλληλουχίας μαζί με τις αλληλουχίες αναφοράς εισάγονται στο πρόγραμμα και δημιουργείται ένα γράφημα το οποίο παρουσιάζει την ομοιότητα του υπό μελέτη δείγματος σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς κατά μήκος της αλληλουχίας, επιτρέποντας έτσι τον εύκολο προσδιορισμό του ανασυνδυασμού.

Για την εμφάνιση της θέσης ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Recco [115], το οποίο επίσης χρησιμοποιεί τη μέθοδο της απόστασης και δημιουργεί μια επεξηγηματική απεικόνιση της θέσης ανασυνδυασμού στις στοιχισμένες αλληλουχίες. Μέσω του προγράμματος RNAFold [116] πραγματοποιήθηκε η μελέτη της δευτεροταγούς δομής των μονόκλωνων RNA μορίων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση ανασυνδιασμών

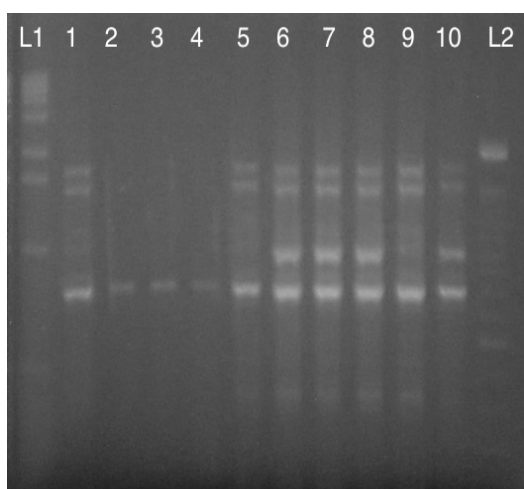
Τα 10 aliquots (Rec 1 έως Rec 10) που προέκυψαν από την ταυτόχρονη μόλυνση Rd κυττάρων με πρότυπα στελέχη Sabin 1 και CAV13 υποβλήθηκαν στις 9 PCR αντιδράσεις που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.9.4. Από τις εννέα αντιδράσεις μόνο στις 3 προέκυψαν θετικά προϊόντα. Στις υπόλοιπες PCR είτε δεν παράγονταν κανένα προϊόν, είτε η εξειδίκευση ήταν χαμηλή με αποτέλεσμα να παράγονται προϊόντα και στους αρνητικούς μάρτυρες Sabin 1 και CAV13 που δεν έφεραν ανασυνδιασμούς.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και των 9 PCR αντιδράσεων για την ανίχνευση ανασυνδιασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13.

	Ζεύγος εκκινητών	Μήκος Προϊόντος	Περιοχή υπό μελέτη	Δείγματα											
				Rec 1	Rec 2	Rec 3	Rec 4	Rec 5	Rec 6	Rec 7	Rec 8	Rec 9	Rec 10	Sabin 1	CAV 13
1	CAV673S SAB2596A	1900bp	5'-UTR – VP1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
2	CAV2519S SAB3950A	1430bp	VP1 – 2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	CAV3840S SAB5207A	1370bp	2B – 3A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
4	CAV5020S SAB6754A	1730bp	2C – 3D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	SAB781S CAV2517A	1740 bp	VP4 – VP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	SAB2366S CAV3521A	1155bp	VP3 – 2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	SAB3466S CAV4153A	690bp	2A – 2C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	SAB4113S CAV5519A	1400bp	2B – 3C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
9	SAB5527S CAV6637A	1110bp	3C – 3D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

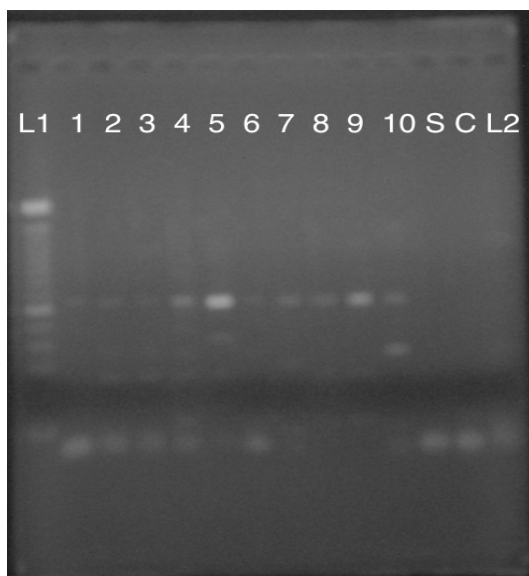
Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα των 9 PCR αντιδράσεων για την ανίχνευση ανασυνδιασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των 10 aliquots για κάθε εκκινητικό ζεύγος που χρησιμοποιήθηκε. Με κίτρινο υποδεικνύονται οι 3 θετικές PCR αντιδράσεις. Με (+) εμφανίζονται τα δείγματα που απέδωσαν το αναμενόμενο μήκος προϊόν, ενώ με (-) η απουσία το προϊόντος αυτού. Τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και CAV13 χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες των αντιδράσεων, καθώς δεν φέρουν ανασυνδιασμούς.

Στις εικόνες που ακολουθούν, παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της 1^{ης} 7^{ης} και 9^{ης} PCR που έδωσαν θετικά αποτελέσματα, έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.



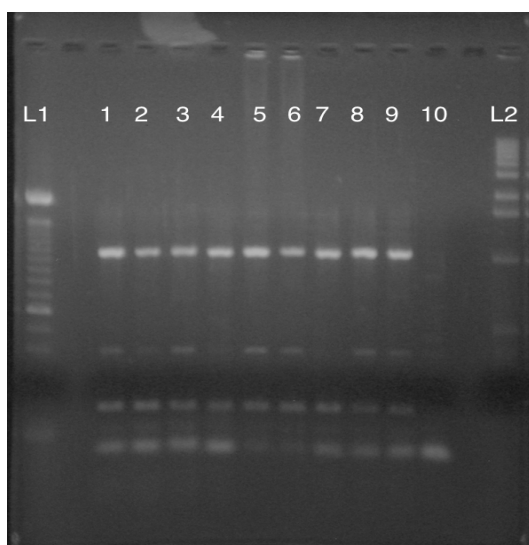
1900 bp

Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 1^{ης} PCR. L1,L2 → μάρτυρες μοριακού βάρους, 1 έως 10 → προϊόντα της PCR με το 1 να είναι το Rec 1 και τα υπόλοιπα με την ίδια σειρά.



690 bp

Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 7^{ης} PCR. L1,L2→ μάρτυρες μοριακού βάρους, 1 έως 10 → προϊόντα της PCR με το 1 να είναι το Rec 1 και τα υπόλοιπα με την ίδια σειρά, S → Sabin 1, C → Coxsackie A13 ως (-) μάρτυρες.



1110 bp

Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 9^{ης} PCR. L1,L2→ μάρτυρες μοριακού βάρους, 1 έως 10 → προϊόντα της PCR με το 1 να είναι το Rec 1 και τα υπόλοιπα με την ίδια σειρά.

4.2 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα προϊόντα των τριών θετικών PCR αντιδράσεων καθαρίστηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια που προέκυψαν στάλθηκαν για αλληλούχηση. Κάθε πλασμίδιο αλληλουχήθηκε εις διπλούν έτσι ώστε να υπάρχει πλήρης κάλυψη του ενθέματος. Με βάση τις 2 αλληλουχίες που προέκυψαν διορθώθηκαν όποια λάθη εντοπίστηκαν κατά την αλληλούχηση και δημιουργήθηκε η αντίστοιχη αλληλουχία για κάθε θετικό προϊόν της προηγούμενης PCR.

Οι αλληλουχίες αυτές στη συνέχεια συγκρίθηκαν με βάση την ομολογία τους με γνωστές κατατεθειμένες αλληλουχίες μέσω του BLAST. Από τα αποτελέσματα του BLAST προέκυψε ότι τα προϊόντα του ζεύγους CAV673S / SAB2596A αποτελούσαν μη ειδικά προϊόντα, καθώς είχε ενισχυθεί περιοχή του κυτταρικού γονιδιώματος προερχόμενη από τα Rd κύτταρα.

Επιπλέον το ζεύγος SAB5527S / CAV6637A απέδωσε προϊόντα που εμφάνιζαν 100% ομολογία με το πρότυπο στέλεχος Sabin 1 και δεν έφεραν κάποιο γεγονός ανασυνδυασμού.

Οι μόνες ειδικές αλληλουχίες που εμφάνιζαν μεταβολές σε σχέση με τα πρότυπα στελέχη ήταν οι αλληλουχίες που προέρχονταν από το ζεύγος SAB3466S / CAV4153A. Οι αλληλουχίες αυτές στοιχήθηκαν μέσω του προγράμματος MEGA7 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των προτύπων στελεχών Sabin 1 και CAV 13 και στα αποτελέσματα της στοίχισης ακολούθησε η ανάλυση των ανασυνδυασμών.

4.3 Ανάλυση των ανασυνδιασμών

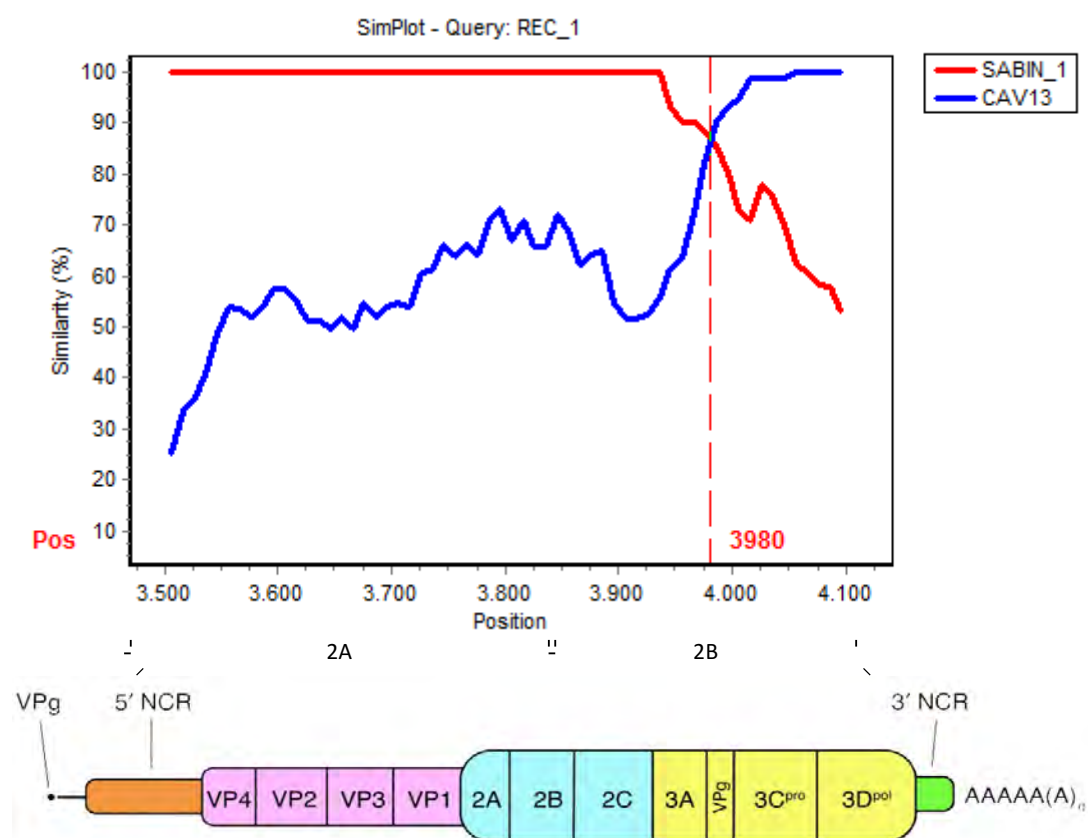
Για κάθε ένα από τα προϊόντα της PCR με εκκινητές το ζεύγος SAB3466S / CAV4153A, δημιουργήθηκε με βάση τη στοίχιση των αλληλουχιών ένα σχεδιάγραμμα SimPlot στο οποίο απεικονίζεται το γεγονός ανασυνδυασμού του κάθε δείγματος. Επιπλέον δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Recco απεικόνιση του τμήματος της θέσης ανασυνδυασμού, αλλά και γύρω από αυτή, με βάση την ομολογία της εκάστοτε υπό μελέτης αλληλουχίας και των αλληλουχιών αναφοράς Sabin 1 και CAV13.

Στα Simplot σχεδιαγράμματα παρουσιάζεται η ποσοστιαία ομοιότητα της υπό μελέτης αλληλουχίας σε σχέση με της αλληλουχίες αναφοράς των προτύπων στελεχών Sabin 1 και CAV13 κατά μήκος της αλληλουχίας. Στη θέση ανασυνδυασμού παρατηρείται μια απότομη πτώση στην ομοιότητα με το αρχικό στέλεχος (Sabin 1) και παράλληλα αυξάνεται η

ομοιότητα με το δεύτερο στέλεχος αναφοράς (CAV13). Σε κάθε σχεδιάγραμμα εντοπίζεται και αναγράφεται επιπλέον και το σημείο ανασυνδυασμού.

Στις απεικονίσεις Recco παρουσιάζεται η περιοχή ανασυνδυασμού κάθε δείγματος και η μεταβολή της ομοιότητας της αλληλουχίας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.

Για το δείγμα Rec 1:

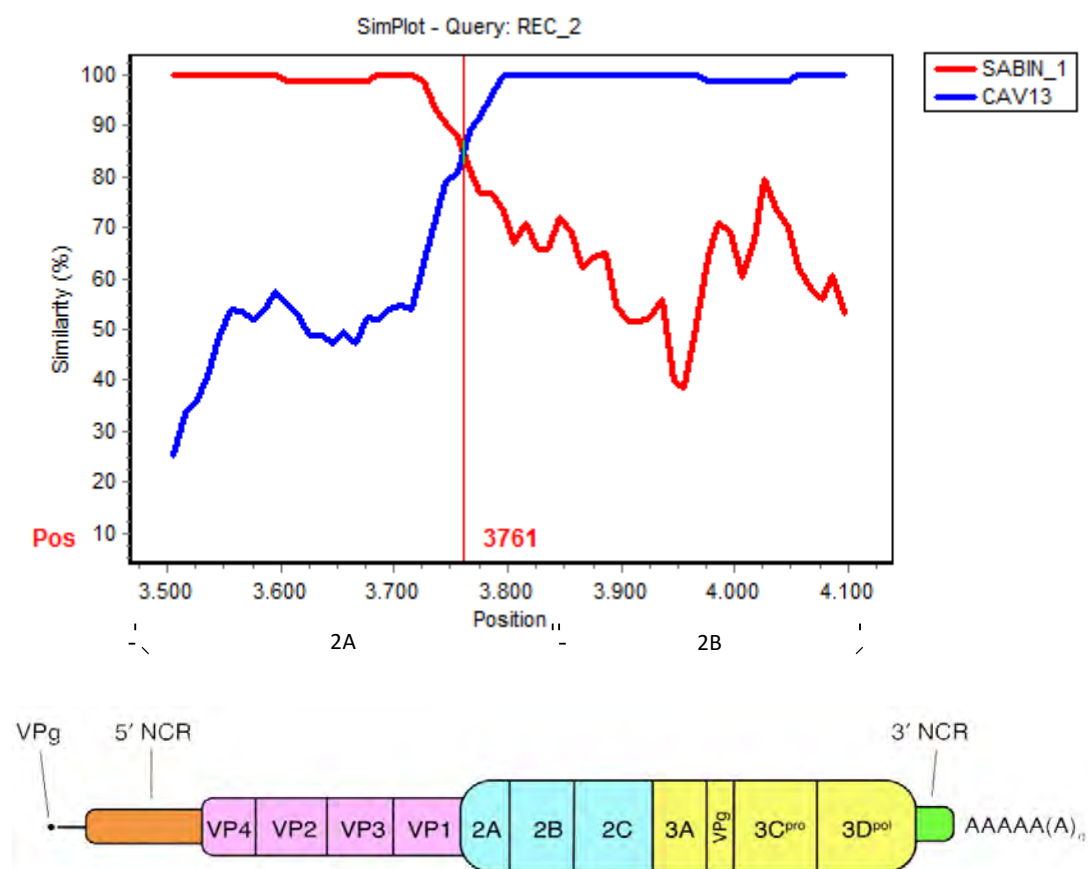


Εικόνα 4.3.1: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 1

		3978	3981
		□	
Rec 1	A A C T T G A T C A A G A T C A T - A G T A G T - C T G G T T A T A A T		
Sabin 1	A A C T T G A T C A A G A T C A T - A T C C T C A C T A G T T A T T A T		
CAV13	A A C T T A A T T A A G T T G A T T A G T A G T - C T G G T T A T A A T		

Εικόνα 4.3.2: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 1

Για το δείγμα Rec 2:

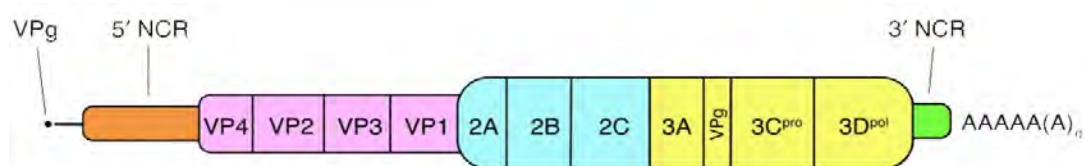
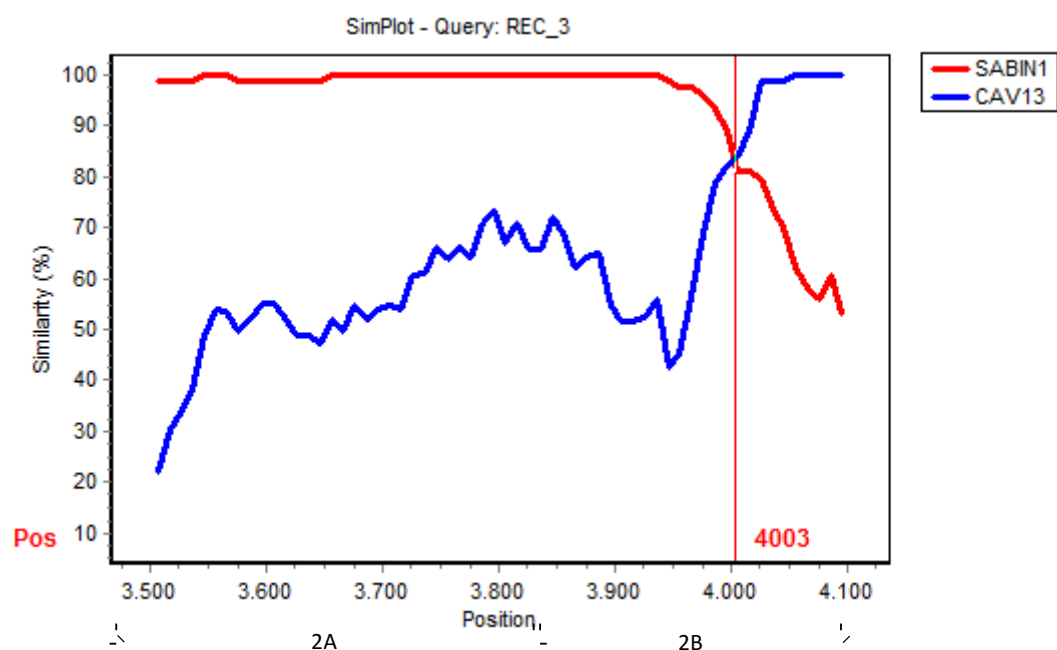


Εικόνα 4.3.3: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 2

		3757		3764																														
			□																															
Rec 2	G	G	G	T	G	A	T	A	G	G	G	A	T	C	A	T	T	A	C	T	G	C	G	G	G	T	G	G	G	A	A	T	G	G
Sabin 1	G	G	G	T	G	A	T	A	G	G	G	A	T	C	A	T	T	A	C	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	A	A	G	G
CAV13	S	T	G	T	C	A	T	G	G	C	C	T	T	A	T	T	A	C	T	G	C	G	G	G	T	G	G	G	A	A	T	G	G	

Εικόνα 4.3.4: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 2

Για το δείγμα Rec 3:

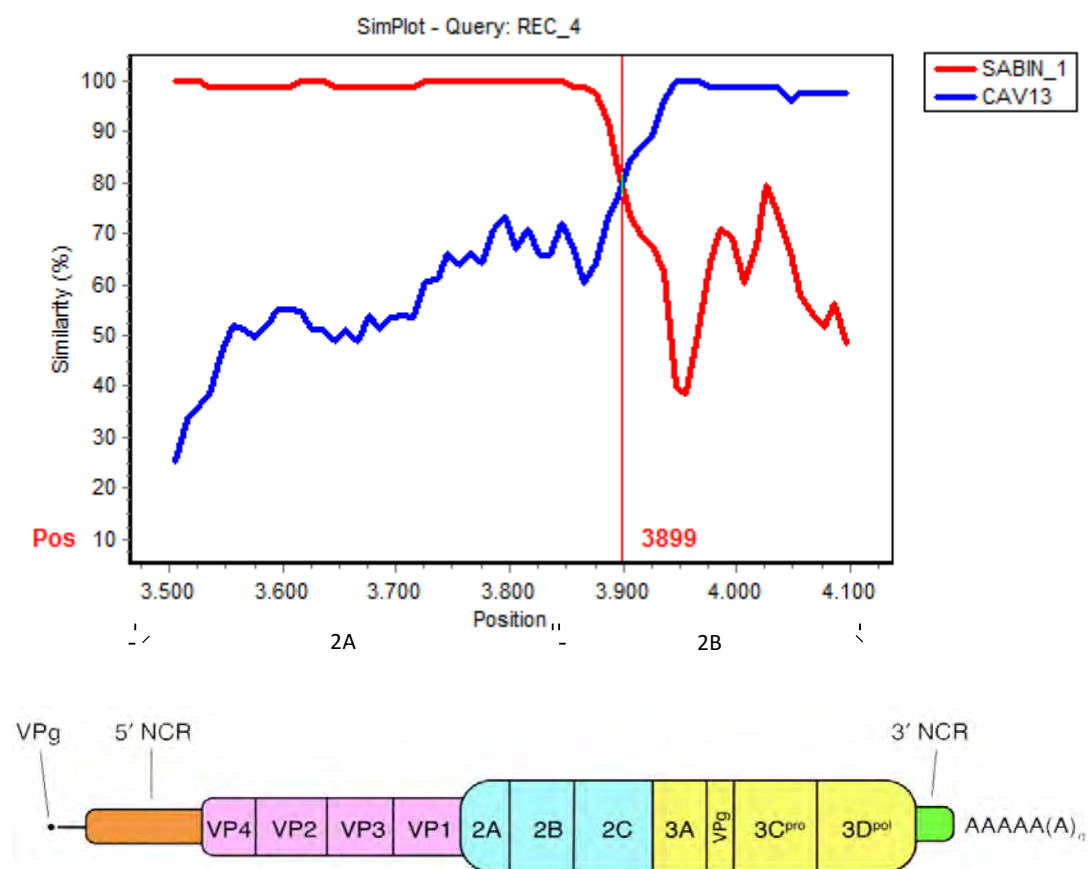


Εικόνα 4.3.5: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 3

	4002	4003
Rec 3	CAAGATCATATCCTCACTGGTTATAATAACTAGGA	
Sabin 1	CAAGATCATATCCTCACTAGTTATTATAACTAGGA	
CAV13	TAAGTTGATTAGTAGTCTGGTTATAATAACTAGGA	

Εικόνα 4.3.6: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 3

Για το δείγμα Rec 4:



Εικόνα 4.3.7: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 4

3894 3904

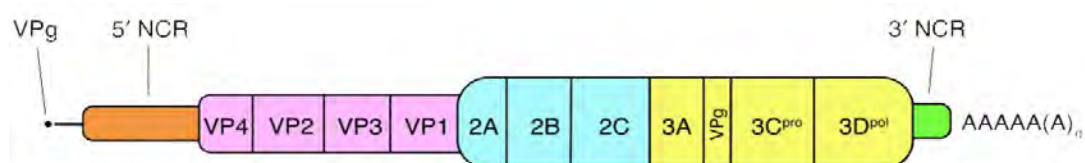
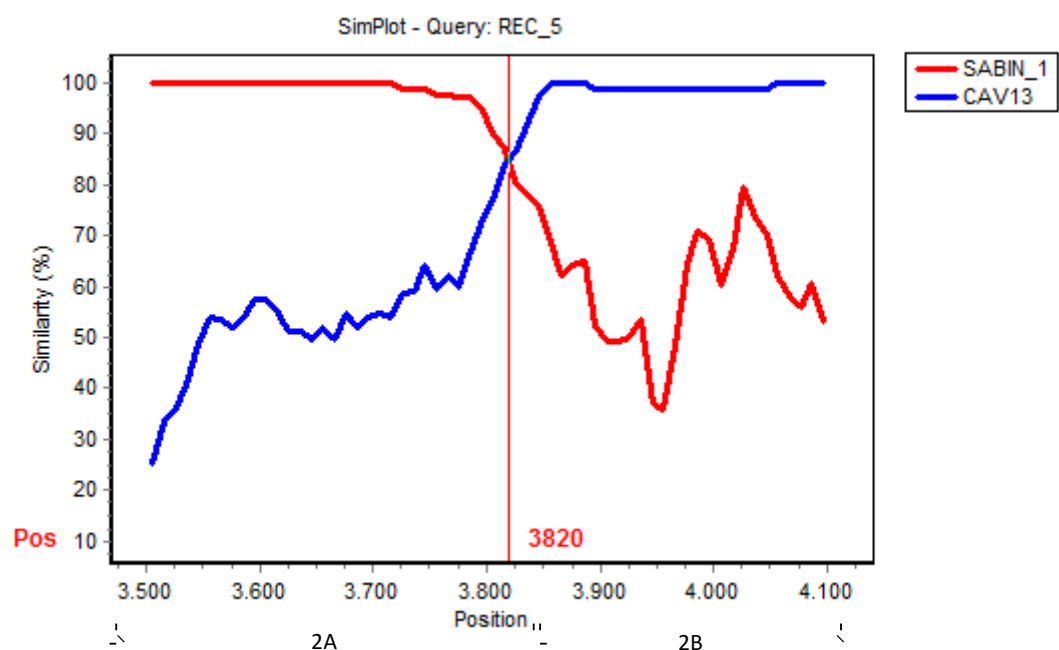
Rec 4 GGTTGGAGACAAAATAACAGAATTGACCTCCATG

Sabin 1 GATTGGAGACAAAATAACAGAGTTGACTAATATG

CAV13 GATTAGTGATAAAATAACAGAATTGACCTCCATG

Εικόνα 4.3.8: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 4

Για το δείγμα Rec 5:

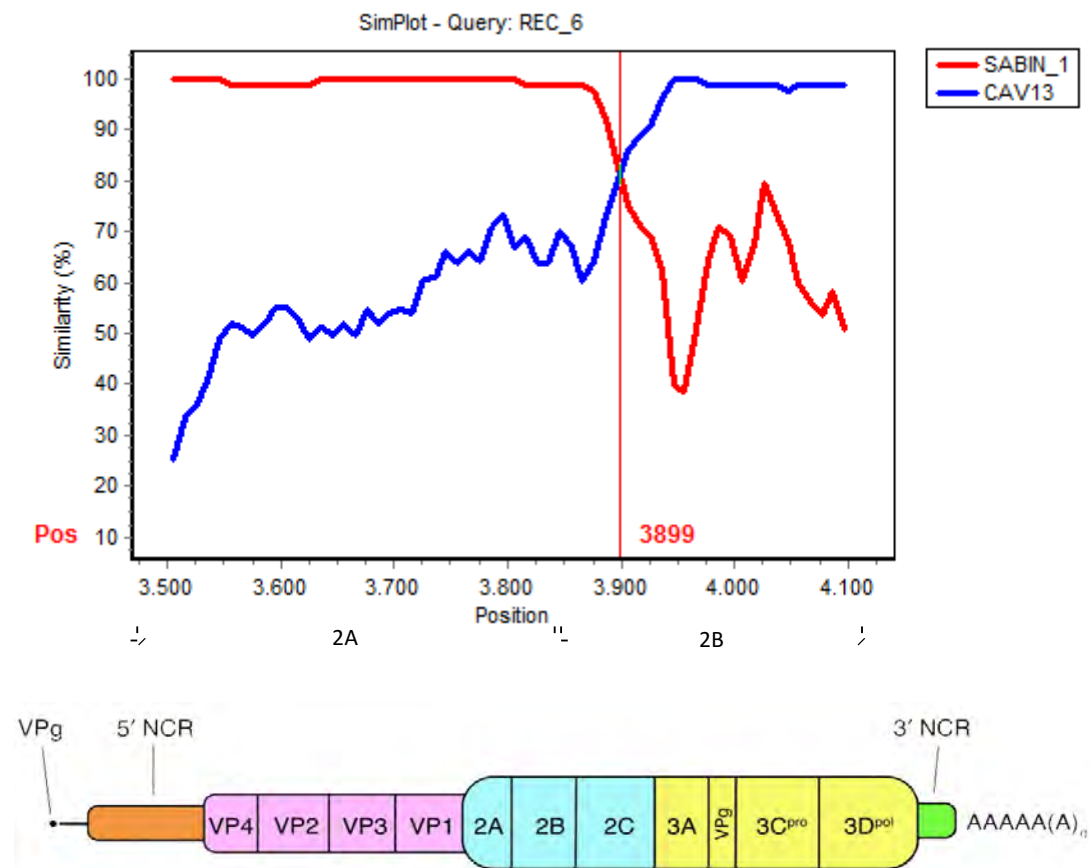


Εικόνα 4.3.9: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 5

	3811	3830
Rec 5	GCCTACGAAGAAGAAGCCATGGAACAGGGTATCA	
Sabin 1	GCCTACGAAGAAGAAGCCATGGAACAAGGCATCA	
CAV13	GT - - A GAAGAAGAAGCCATGGAACAGGGTATCA	

Εικόνα 4.3.10: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 5

Για το δείγμα Rec 6:

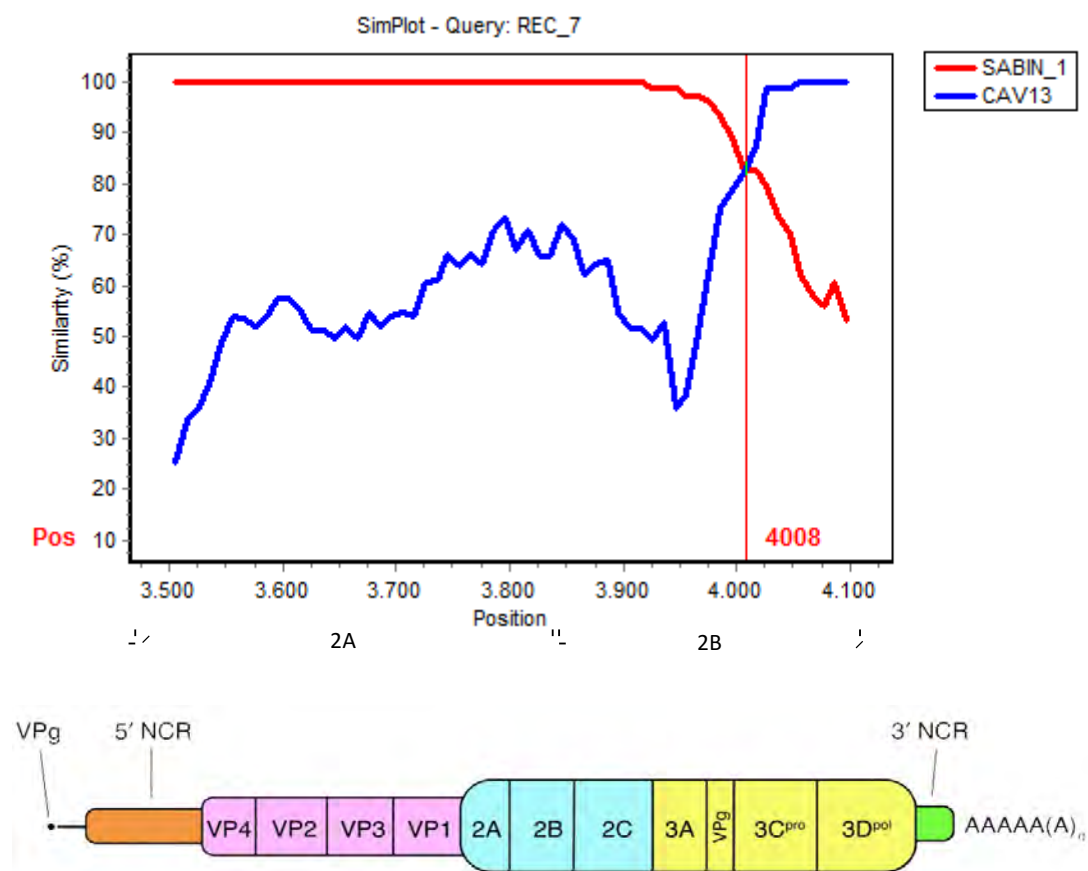


Εικόνα 4.3.11: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 6

	3894	3904
Rec 6	GGTTGGAGACAAAATAACAGAATTGACCTCCATG	
Sabin 1	GATTGGAGACAAAATAACAGA	GTTGACTAATATG
CAV13	GATTAGTGATAAAATAACAGAATTGACCTCCATG	

Εικόνα 4.3.12: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 6

Για το δείγμα Rec 7:



Εικόνα 4.3.13: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 7

4006 4010

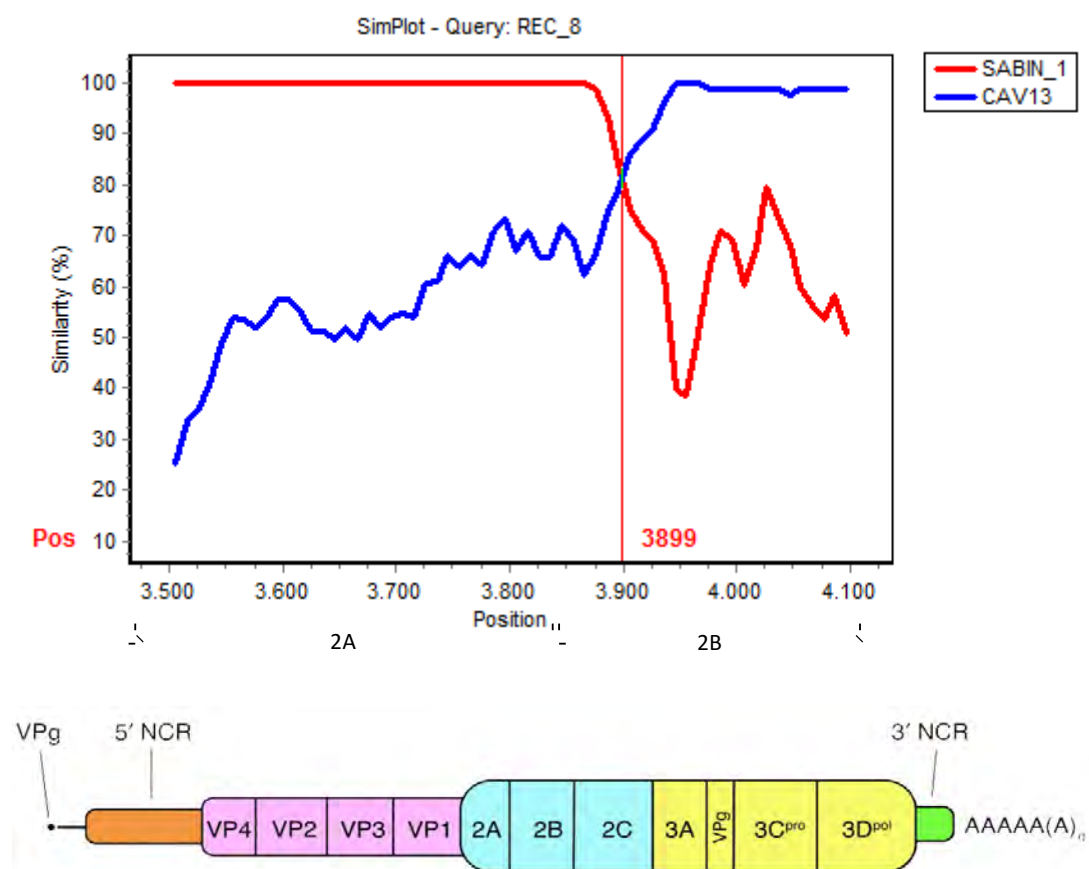
Rec 7 ATCCTCACTAGTTATAAATAACTAGGAATTACGAA

Sabin 1 ATCCTCACTAGTTAT TATAACTAGGAATTATGAA

CAV13 TAGTAGTCTG GTTATAAATAACTAGGAATTATGAA

Εικόνα 4.3.14: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 7

Για το δείγμα Rec 8:

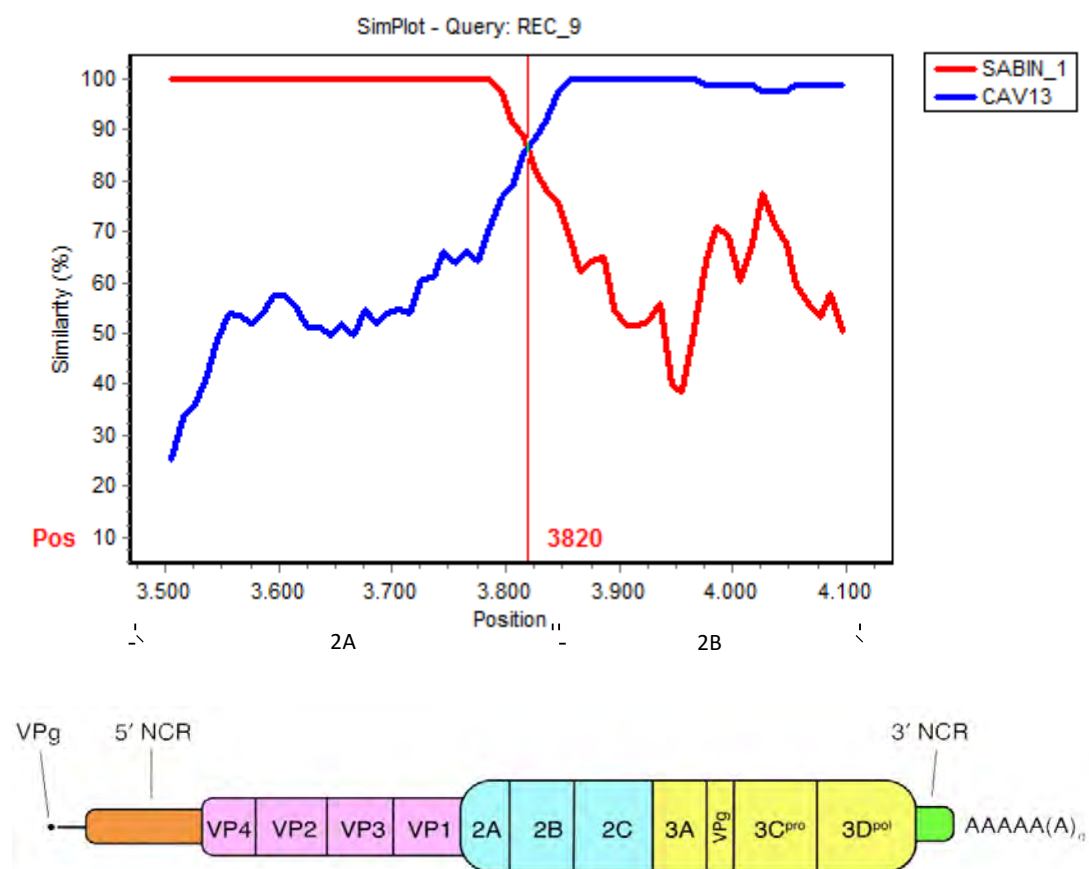


Εικόνα 4.3.15: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 8

	3894		3904
	□		
Rec 8	GATTGGAGACAAAATAACAGAATTGACCTCCATG		
Sabin 1	GATTGGAGACAAAATAACAGAGTTGACTAATATG		
CAV13	GATTAGTGATAAAATAACAGAATTGACCTCCATG		

Εικόνα 4.3.16: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 8

Για το δείγμα Rec 9:

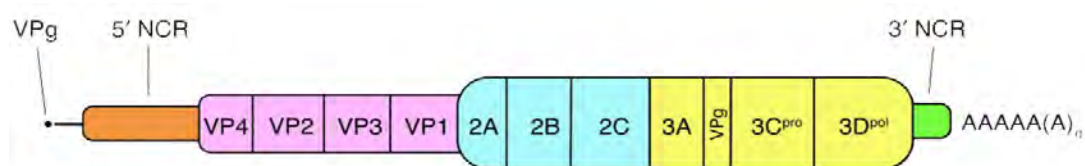
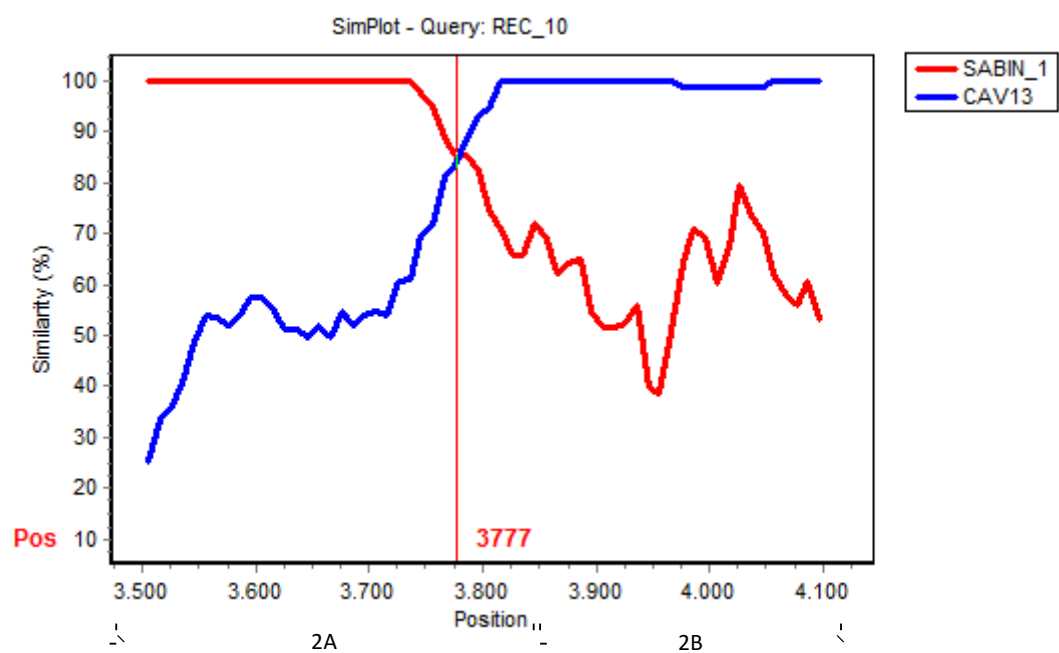


Εικόνα 4.3.17: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 9

	3811	3830
Rec 9	GCCTACGAAGAAGAAGCCATGGAAACAGGGTATCA	
Sabin 1	GCCTACGAAGAAGAAGCCATGGAAACAAGGCATCA	
CAV13	GT - - - A GAAGAAGAAGCCATGGAAACAGGGTATCA	

Εικόνα 4.3.18: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 9

Για το δείγμα Rec 10:



Εικόνα 4.3.19: SimPlot ανάλυση του δείγματος Rec 10

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Εικόνα 4.3.20: Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του δείγματος Rec 10

Συγκεντρωτικά από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν 7 διαφορετικοί τύποι ανασυνδυασμού. Ένας τύπος ανασυνδυασμού εμφανίστηκε σε τρία διαφορετικά aliquots ενώ ακόμη ένας σε 2 διαφορετικά. Όλοι οι ανασυνδυασμοί που ανιχνεύτηκαν εντοπίζονται στις περιοχές 2A και 2B.

Στον παρακάτω πίνακα συγκεντρώνονται όλα τα παραπάνω αποτελέσματα των αναλύσεων των ανασυνδυασμών μεταξύ Sabin 1 και CAV13.

Τύπος Ανασυνδυασμού	Γενωμική Περιοχή	Σημείο Ανασυνδυασμού	Περιοχή Ανασυνδυασμού	Αριθμός Εμφανίσεων
S1/CAV13	2A	3761nt	3757nt – 3764nt	1
S1/CAV13	2A	3777nt	3774nt – 3781nt	1
S1/CAV13	2A	3820nt	3811nt – 3830nt	2
S1/CAV13	2B	3899nt	3894nt – 3904nt	3
S1/CAV13	2B	3980nt	3978nt – 3981nt	1
S1/CAV13	2B	4003nt	4002nt – 4003nt	1
S1/CAV13	2B	4008nt	4006nt – 4010nt	1

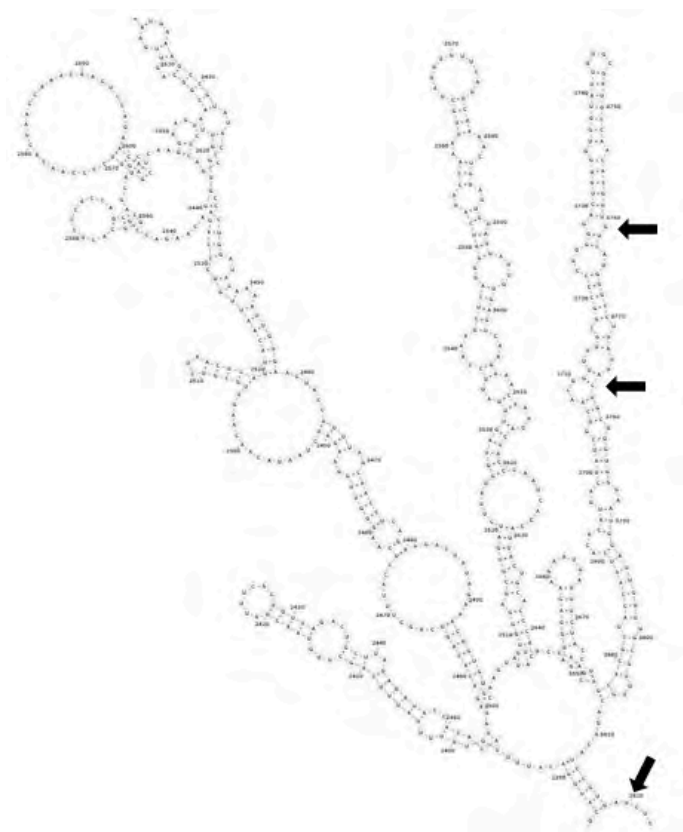
Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας των ανασυνδυασμών

4.4 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των RNA μορίων στις περιοχές των ανασυνδυασμών

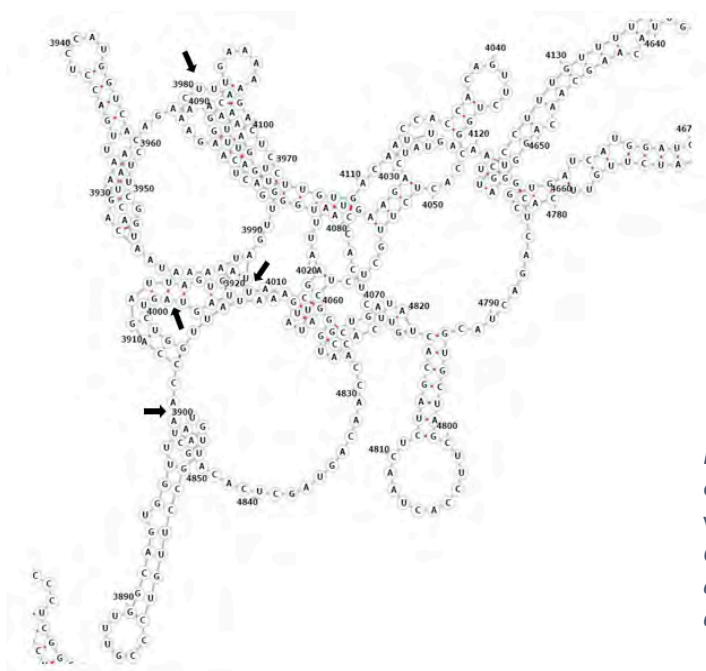
Γενικά για τους ανασυνδυασμούς των εντεροϊών αναφερθήκαμε στην παράγραφο 1.8. Όπως αναφέρθηκε, ένας βασικός παράγοντας που πιθανολογείται ότι διευκολύνει τον τερματισμό της RNA σύνθεσης και της συνέχισής της σε ένα άλλο μόριο, είναι η ύπαρξη δευτεροταγών δομών στην περιοχή του ανασυνδυασμού.

Επιπλέον αναφέρθηκε πως ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου. Οπότε, με βάση τον παραπάνω ισχυρισμό, οι ανασυνδυασμοί της εργασίας αυτής δημιουργήθηκαν όταν, κατά τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου του CAV13 στελέχους, το αντιγραφικό σύμπλοκο μεταπήδησε στον Sabin 1 κλώνο, συναντώντας μια δευτεροταγή δομή που εμποδίζει την ολοκλήρωση της αντιγραφής.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα βιοπληροφορικής RNAFold, σχεδιάστηκε η δευτεροταγής δομή τόσο ολόκληρου του RNA μορίου του στελέχους CAV13, όσο και της γενωμικής περιοχής 2A-2B στην οποία εντοπίστηκαν οι ανασυνδυασμοί παραπάνω, με βάση την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια του μορίου (MFE). Και στις 2 περιπτώσεις στις περιοχές των ανασυνδυασμών εντοπίστηκαν δευτεροταγείς δομές οι οποίες πιθανόν να ευθύνονται για την εμφάνιση των ανασυνδυασμών.



Εικόνα 4.4.1: Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της 2Α γενωμικής περιοχής για το στέλεχος CAV13. Με βέλη υποδεικνύονται τα σημεία των ανασυνδυασμών που ανιχνεύτηκαν στη 2Α περιοχή στην εργασία αυτή.



Εικόνα 4.4.2: Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της 2Β γενωμικής περιοχής για το στέλεχος CAV13. Με βέλη υποδεικνύονται τα σημεία των ανασυνδυασμών που ανιχνεύτηκαν στη 2Β περιοχή.

Από τις δυο παραπάνω εικόνες παρατηρείται η πιθανή ύπαρξη συγκεκριμένων δευτεροταγών δομών στις περιοχές των ανασυνδυασμών που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία. Ιδιαίτερα στη δεύτερη εικόνα, όπου αναπαρίστανται οι πιθανές δευτεροταγές δομές της 2Β γενωμικής περιοχής, παρατηρείται μια εντονότερη και πολυπλοκότερη διαμόρφωση σε σχέση με τη διαμόρφωση της 2Α περιοχής, στο πρότυπο στέλεχος CAV13.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος *Enterovirus*. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί, ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως [23]. Σχετίζονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματικές μολύνσεις έως και σοβαρές ασθένειες. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν: το κοινό κρυολόγημα, η ασθένεια των χεριών, των ποδιών και του στόματος (HFMD), οξεία χαλαρή παράλυση, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα [118,119]. Η μετάδοση των εντεροϊών πραγματοποιείται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων [120]. Η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα με μολυσμένα κόπρανα, μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού [120,121]. Όπως, αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Έτσι, μπορούν να κυκλοφορούν «σιωπηλά» μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να ελλοχεύει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις. Για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη και άμεση διάγνωση τους.

Στην εισαγωγή αναφέραμε τα οφέλη της παγκόσμιας κοινότητας από τη χρήση του OPV εμβολίου η οποία ήταν τεράστια. Όμως, μια συνεχιζόμενη χρήση του εμβολίου αυτού, εκτός από τους κινδύνους που επιφέρει η VAPP, μπορεί να επιφέρει μια έξαρση εμβολιοπροερχόμενων πολιοϊών (VDPVs). Οι VDPVs προέρχονται από το OPV, αλλά διαφέρουν από τα στελέχη του OPV και τα στελέχη που απομονώνονται από άτομα έπειτα από εμβολιασμό με OPV, έχοντας περισσότερες του 1% νουκλεοτιδικές αλλαγές στην κωδική περιοχή της VP1 [122]. Τέτοια στελέχη ευθύνονται για εξάρσεις πολιομυελίτιδας στην νήσο Ισπανιόλα [123], στις Φιλιππίνες [124], στην Αίγυπτο [125], στη Μαδαγασκάρη [126] και στη Νιγηρία [127]. Ανάλυση των αλληλουχιών σε αρχικά αλλά και μεταγενέστερα δείγματα cVDPV αποκάλυψε ότι η 5'-UTR, η μη-δομική αλλά και η 3' UTR προέρχονταν από ιό της ομάδας C, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι στελέχη του OPV και EV-Cs έχουν συχνές γενετικές ανταλλαγές [125].

Μελετώντας τα γενετικά χαρακτηριστικά των ανασυνδυασμένων γενωμάτων των cVDPVs, ανακαλύφθηκε ότι όλα τα γενώματα είχαν διατηρήσει τουλάχιστον ολόκληρη την περιοχή που κωδικοποιεί για τις καψιδιακές πρωτεΐνες από τα αντίστοιχα εμβολιακά στελέχη

και μερικό ή όλο το υπόλοιπο γονιδίωμα, ιδιαίτερα η περιοχή των μη-δομικών πρωτεϊνών, προέρχεται από EV-Cs [123,125,128,129,130]. Τα περισσότερα από αυτά έδειχναν το 3'-μέσο των γενωμάτων τους να προέρχεται από μη-Sabin αλληλουχίες με τις θέσεις ανασυνδυασμού να εντοπίζονται στις πρωτεΐνες 2A ή 2B [123,124,125,129]. Ωστόσο, οι θέσεις ανασυνδυασμού μπορούσαν να βρίσκονται σε διαφορετικό σημείο της P2 ή P3 περιοχής [128,130]. Επιπροσθέτως, πολλά VDPVs τύπου 2 εμφάνιζαν ένα μεγάλο μέρος της 5'-UTR να προέρχεται από μη-Sabin EV-Cs. Στην περίπτωση αυτή, μερικά από τα δείγματα αυτά διατηρούσαν μόνο την κωδικοποιούσα περιοχή του καψιδίου από τα αρχικά OPV στελέχη. Πιο πολύπλοκες γενωμικές δομές βρέθηκαν στη Μαδαγασκάρη κατά την έξαρση των VDPVs που παρατηρήθηκε το 2005. cVDPVs τύπου 2 εμφάνιζαν ένα μωσαϊκό τετραμερές ανασυνδυασμένο γονιδίωμα που αποτελούταν από μη-Sabin αλληλουχίες στην 5'-UTR και στις P2, P3 περιοχές, καψιδιακές αλληλουχίες του Sabin 2 και Sabin 3 στο 3' άκρο του [130].

Η ανακάλυψη ότι μερικά ανασυνδυασμένα cVDPV γενώματα είχαν διατηρήσει μόνο τις κωδικοποιούσες περιοχές του καψιδίου από τα αρχικά Sabin στελέχη [87,101,125,128,130] απέδειξε ότι όλα τα υπόλοιπα μέρη του γονιδιώματος μπορούν να μοιράζονται μεταξύ άλλων EV-Cs. Το καψίδιο των εντεροϊών, που σπανίως υπόκειται σε ανασυνδυασμό [134,135], φαίνεται ως η κύρια ιική δομή που καθορίζει τον τύπο του ιού.

Ετσι πραγματοποιήθηκε μόλυνση κυττάρων Rd ταυτόχρονα με τα στελέχη Sabin 1 και CAV13 χρησιμοποιώντας τον αντίστοιχο ιικό τίτλο έτσι ώστε να επιτευχθεί MOI = 10. Με τον υψηλό συντελεστή μόλυνσης επιτυγχάνεται η συνθήκη της υπερμόλυνσης των κυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για την δημιουργία ανασυνδυασμών.

Η αρχική μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε πλάκα κυτταροκαλλιιεργειών 24 θέσεων όπου είχαν προστεθεί αρχικά κύτταρα Rd. Δύο ώρες μετά τη μόλυνση το υπερκείμενο σε κάθε θέση της πλάκας αφαιρέθηκε και προστέθηκε εκ νέου θρεπτικό κυτταροκαλλιιεργειας άνευ ορού. Το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομάκρυνση των ιικών σωματιδίων που δεν είχαν εισέλθει στα κύτταρα. Τα ανασυνδυασμένα γενώματα που προκύπτουν ανά κύκλο αντιγραφής αποτελούν το 10-20% [133]. Αν στο υλικό παρέμεναν και τα ιοσωμάτια που δεν είχαν εισέλθει στα κύτταρα, τότε το ποσοστό αυτό θα μειωνόταν σημαντικά, δυσκολεύοντας έτσι αρκετά τη διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και προτύπων στελεχών.

Το υλικό της κυτταροκαλλιιεργειας συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση και χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση 10 διαφορετικών θέσεων σε πλάκα κυτταροκαλλιιεργειών

96 θέσεων όπου είχαν προστεθεί κύτταρα Rd, δημιουργώντας έτσι 10 διαιρέσεις (aliquots) της αρχικής μόλυνσης. Μέσω της δημιουργίας των aliquots επεκτείνεται η μελέτη σε περισσότερα δείγματα και δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης, εφόσον έχουν συμβεί, περισσότερων γεγονότων ανασυνδυασμού. Στην περίπτωση που η μελέτη γινόταν χωρίς το ενδιάμεσο βήμα των aliquots, θα ανιχνεύονταν μόνο ο επικρατέστερος ανασυνδυασμός, περιορίζοντας έτσι τα αποτελέσματα της μελέτης.

Η ανίχνευση των ανασυνδυασμών πραγματοποιήθηκε με μια σειρά από PCR αντιδράσεις. Για τις αντιδράσεις αυτές είχαν σχεδιαστεί 18 εκκινητικά μόρια. Οι εννέα εκκινητές με βάση το σχεδιασμό τους μπορούσαν να υβριδιστούν με πλήρη ταύτιση (complete match) πάνω στο γονιδίωμα του Sabin 1 στελέχους, παρουσιάζοντας όμως παράλληλα τουλάχιστον 2 αταίριαστα ζεύγη (mismatch) στα 4 νουκλεοτίδια του 3' άκρου τους πάνω στο γονιδίωμα του CAV13 στελέχους. Οι υπόλοιποι εννέα εκκινητές παρουσίαζαν την αντίστροφη εικόνα, έχοντας πλήρη ταύτιση με το CAV13 στέλεχος και αταίριαστα ζεύγη με το Sabin 1 στέλεχος. Κάθε ζεύγος εκκινητών είχε έναν εκκινητή με πλήρη ταύτιση στο Sabin 1 και έναν με πλήρη ταύτιση στο CAV13. Έτσι, στις PCR αντιδράσεις που ακολούθησαν ενισχύονται μόνο τμήματα που φέρουν ανασυνδυασμούς, χωρίς να ενισχύονται οι πρότυπες αλληλουχίες. Επιπλέον, στο σύνολό τους οι εκκινητές αυτοί προσφέρουν κάλυψη στο μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος, από την 5'-UTR έως και την 3D γενωμική περιοχή.

Από τις 9 PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν μόνο η 7^η (με το εκκινητικό ζεύγος SAB3466S / CAV4153A) απέδωσε ένα προϊόν αναμενόμενου μήκους (690bp) του οποίου η αλληλουχία ήταν ανασυνδυασμένη. Στα υπόλοιπα ζεύγη δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση των αντίστοιχων προϊόντων. Μια εξήγηση της εικόνας αυτής είναι ότι στα υπό μελέτη δείγματα δεν υπήρχαν ανασυνδυασμοί μεταξύ των περιοχών όπου στόχευαν οι εκκινητές αυτοί. Επιπλέον, οι συνθήκες της PCR για κάθε εκκινητικό ζεύγος προσαρμόζονταν έτσι ώστε να επιτυγχάνεται μεγάλη εξειδίκευση. Χρησιμοποιώντας τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και CAV13 ως αρνητικούς μάρτυρες, οι συνθήκες προσαρμόζονταν αρχικά έτσι ώστε να μην εμφανίζονται προϊόντα στους αρνητικούς μάρτυρες. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.9.2, σε δύο περιπτώσεις η θερμοκρασία υβριδισμού είναι αυξημένη (57°C και 63°C), γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία, είναι πιθανό να υπάρχει ο αντίστοιχος ανασυνδυασμός σε μικρό βαθμό αλλά να μην μπορεί να ανιχνευτεί λόγω μειωμένης ευαισθησίας. Μια τρίτη πιθανή εξήγηση της απουσίας προϊόντων με τη χρήση των υπόλοιπων ζευγών είναι και η εμφάνιση πιθανών μεταλλάξεων. Ο ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων στους εντεροϊούς είναι αρκετά αυξημένος [81], με αποτέλεσμα να διαφέρουν

σε ένα ποσοστό οι κατατεθειμένες αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών με τα υπό μελέτη δείγματα. Οπότε εάν μια μετάλλαξη εντοπίζεται κοντά στο 3' άκρο των εκκινητών είναι πιθανό να αποτρέπει την ενίσχυση του αναμενόμενου τμήματος.

Έπειτα από αλληλούχηση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που προερχόταν από το προϊόν του ζεύγους SAB3466S / CAV4153A και στα 10 aliquots, ανιχνεύτηκαν 7 διαφορετικοί τύποι ανασυνδυασμού. Τρεις τύποι ανασυνδυασμού εντοπίστηκαν στη 2A γενωμική περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3761 - 3820 και 4 τύποι ανασυνδυασμού στη 2B γενωμική περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3899 – 4008, γεγονός που επιβεβαιώνει την υψηλή συχνότητα εμφάνισης ετεροτυπικών ανασυνδυασμών στη μη-δομική περιοχή των εντεροϊών της ομάδας C και συγκεκριμένα στις γενωμικές περιοχές 2A ή 2B [123,124,125,129] όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.3.

Αν και ο αντιγραφικός μηχανισμός (ή μηχανισμός αλλαγής μήτρας), που θεωρείται ο επικρατέστερος για τα γεγονότα ανασυνδυασμού στους εντεροϊούς [90], δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ο ιδιαίτερος ρόλος των δευτεροταγών δομών του RNA μορίου [134].

Με βάση τα παραπάνω έγινε μια προσπάθεια ανίχνευσης πιθανών δευτεροταγών δομών που να δικαιολογούν τους ανασυνδυασμούς που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα πτυχιακή. Μέσω ειδικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής σχεδιάστηκαν οι πιθανές δευτεροταγές δομές των 2A και 2B γενωμικών περιοχών με βάση το μοντέλο της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια υψηλή πιθανότητας ύπαρξης δευτεροταγών δομών και στις δύο γενωμικές περιοχές.

Εν κατακλείδι, μελετήθηκε η θέση και ο τύπος ανασυνδυασμού που προκύπτει *in vitro*, έπειτα από ταυτόχρονη μόλυνση με πρότυπα Sabin 1 και CAV 13 στελέχη. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επαληθεύουν ως τις συχνότερες θέσεις του ετεροτυπικού ανασυνδυασμού τις γενωμικές περιοχές 2A και 2B και επιπλέον ενισχύουν την υπόθεση της ύπαρξης συσχέτισης των δευτεροταγών RNA δομών κοντά στις θέσεις ανασυνδυασμού.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Johnson, R. T. (1998). *Viral infections of the nervous system* (2nd ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven.
2. Heine J. Beobachtungen über Lahmungs Zustände der untern Extremitäten und deren Behandlung. Stuttgart, Germany: Kohler; 1840.
3. Medin O. Ueber eine Epidemie von spinaler Kinderlahmung. Verh X Int Med Kongr, 1891.
4. Charcot JM, Joffroy A (1870). Cas de paralysie infantile spinale avec lesions des cornes antérieures de la substance grise de la moelle épinière. Arch Physiol Norm Pathol 3, 134–152
5. Wickman I. Beiträge zur Kenntnis der Heine-Medinischen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkrankungen). Berlin: Karger; 1907.
6. Trask, J. D., Vignec, A. J., & Paul, J. R. (1938). Poliomyelitis virus in human stools. JAMA, 111(1), 6-11.
7. Landsteiner K, Popper E. Mikroskopische (1908). Präparate von einem menschlichen und zwei Affenrückenmarken. Wien Klin Wochenschr 21, 1830.
8. Paul, J. R. (1971). A history of poliomyelitis: New Haven & London: Yale Univ, Press.
9. Burnet, F. M. (1945). Poliomyelitis in the light of recent experimental work. Health Bull (Melb)(81-82), 2173-2177.
10. Birmingham ME, Aylward RB, Cochi SL, et al. (1997). National immunization days: state of the art. J Infect Dis, 175 [Suppl 1] S183–S188.
11. Enders, J. F., Weller, T. H., & Robbins, F. C. (1949). Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. Science, 109(2822), 85-87.
12. Bodian, D., Morgan, I. M., & Howe, H. A. (1949). Differentiation of types of poliomyelitis viruses; the grouping of 14 strains into three basic immunological types. Am J Hyg, 49(2), 234-245.
13. Aycock, W. L. (1928). The Significance of the Age Distribution of Poliomyelitis. Evidence of Transmission through Contact. Am J Hyg, 8, 35-54.
14. Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., et al. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature, 291(5816), 547-553.
15. Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981b). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc Natl Acad Sci USA, 78(8), 4887-4891.
16. Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981a). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Science, 214(4523), 916-919.
17. Hogle, J. M., Chow, M., & Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. Science, 229(4720), 1358-1365.
18. Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell, 56(5), 855-865.
19. Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., et al. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. Proc Natl Acad Sci USA, 88(3), 951-955.
20. Ren, R. B., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J., & Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. Cell, 63(2), 353-362.
21. Lauber C, Gorbalenya AE. (2012). Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. J. Virol. 86:3890–3904
22. Pallansch, M., Oberste, S., & Whitton, L. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), Fields virology (6th ed., pp. 490-530). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

23. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. (2006) Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ.* 55:1–20.
24. Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins
25. Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., et al. (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol*, 161(10), 2921-2949.
26. Knowles, N. J., Hovi, T., Hyypia, T., King, A. M. Q., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., et al. (2012). Family - Picornaviridae. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy* (pp. 855-880). San Diego: Elsevier.
27. Flanagan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(3), 961-965.
28. Melnick J. (1990) *L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses*. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.), 549 – 605.
29. Flanagan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(3), 961-965.
30. Caspar, D. L., & Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24.
31. Rueckert, R. R., Dunker, A. K., & Stoltzfus, C. M. (1969). The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 62(3), 912-919.
32. Hogle, J. M., Chow, M., & Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229(4720), 1358-1365.
33. Stanway G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71(11): 2483-2501
34. Pfister, T., Mirzayan, C., & Wimmer, E. (1999). POLIOVIRUSES (PICORNAVIRIDAE) | *Molecular Biology A2 - Granoff, Allan*. In R. G. Webster (Ed.), *Encyclopedia of Virology* (Second Edition) (pp. 1330-1348). Oxford: Elsevier.
35. Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J., & Brown, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327(6122), 482-486.
36. Filman, D. J., Syed, R., Chow, M., Macadam, A. J., Minor, P. D., & Hogle, J. M. (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *Embo j*, 8(5), 1567-1579.
37. Lentz, K. N., Smith, A. D., Geisler, S. C., Cox, S., Buontempo, P., Skelton, A., et al. (1997). Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure*, 5(7), 961-978.
38. Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., & Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(1), 59-63.
39. Nomoto, A., Detjen, B., Pozzatti, R., & Wimmer, E. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268(5617), 208-213.
40. Pettersson, R. F., Ambros, V., & Baltimore, D. (1978). Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol*, 27(2), 357-365.
41. Van Ooij, M. J. M., Polacek, C., Glaudemans, D. H. R. F., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J. M., Andino, R., ... Melchers, W. J. G. (2006). Polyadenylation of genomic RNA and initiation of antigenomic RNA in a positive-strand RNA virus are controlled by the same cis-element. *Nucleic Acids Research*, 34(10), 2953–2965.

42. Racaniello, V. R. (2013). Picornaviridae: The viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 452-489). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
43. Summers, D. F., & Maizel, J. V., Jr. (1968). Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 59(3), 966-971.
44. Jacobson, S. J., Konings, D. A., & Sarnow, P. (1993). Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*, 67(6), 2961-2971.
45. Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., et al. (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 119-128.
46. Brown, D. M., Cornell, C. T., Tran, G. P., Nguyen, J. H. C., & Semler, B. L. (2005). An Authentic 3' Noncoding Region Is Necessary for Efficient Poliovirus Replication. *J Virol*, 79(18), 11962-11973.
47. Todd, S., Towner, J. S., Brown, D. M., & Semler, B. L. (1997). Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol*, 71(11), 8868-8874.
48. Yogo, Y., Teng, M.-h., & Wimmer, E. (1974). Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun*, 61(4), 1101-1109.
49. Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5), 855-865.
50. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. (2002) Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 10(7): 324–331.
51. Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., et al. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(3), 951-955.
52. Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981a). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214(4523), 916-919.
53. Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol*, 64(5), 1934-1945.
54. Ambros, V., & Baltimore, D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*, 255(14), 6739-6744.
55. Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H., & Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol*, 74(22), 10359-10370.
56. Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D. W., van Boom, J. H., & Wimmer, E. (2000). Genetic and Biochemical Studies of Poliovirus cis-Acting Replication Element cre in Relation to VPg Uridylylation. *J Virol*, 74(22), 10371-10380.
57. Yin, J., Paul, A. V., Wimmer, E., & Rieder, E. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol*, 77(9), 5152-5166.
58. Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. (2003) Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 77:5136–5144.
59. Murray KE, Barton DJ. (2003) Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 77:4739–4750.
60. Dales, S., Eggers, H. J., Tamm, I., & Palade, G. E. (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology*, 26(3), 379-389.
61. Schlegel, A., Giddings, T. H., Ladinsky, M. S., & Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol*, 70(10), 6576-6588.

62. Bienz, K., Egger, D., & Pasamontes, L. (1987). Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology*, 160(1), 220-226.
63. Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K., & Ehrenfeld, E. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology*, 202(1), 129-145.
64. Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., & Bienz, K. (2000). Formation of the Poliovirus Replication Complex Requires Coupled Viral Translation, Vesicle Production, and Viral RNA Synthesis. *J Virol*, 74(14), 6570-6580.
65. Echeverri, A. C., & Dasgupta, A. (1995). Amino Terminal Regions of Poliovirus 2C Protein Mediate Membrane Binding. *Virology*, 208(2), 540-553.
66. Gamarnik, A. V., & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12(15), 2293-2304.
67. Novak, J. E., & Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol*, 65(6), 3384-3387.
68. Ansardi DC, Luo M, Morrow CD. (1994) Mutations in the poliovirus P1 capsid precursor at arginine residues VP4-ARG34, VP3-ARG223, and VP1-ARG129 affect virus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Virology* 199: 20-34
69. Marc D, Drugeon G, Haenni AL, et al. (1989) Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence. *EMBO J* 8:2661-2668
70. Marc D, Girard M, van der Werf S. (1991) A Gly1 to Ala substitution in poliovirus capsid protein VP0 blocks its myristoylation and prevents viral assembly. *JGen Virol* 72:1151-1157
71. Marc D, Masson G, Girard M, et al. (1990) Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0⁺ prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles. *J Virol* 64:4099-4107
72. Moscufo N, Chow M. (1992) Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol* 66:6849-6857
73. Tucker, S. P., Thornton, C. L., Wimmer, E., & Compans, R. W. (1993). Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J Virol*, 67(7), 4274-4282.
74. Guskey et al. (1970), Patterns of Cytopathology and Lysosomal Enzyme Release in Poliovirus-infected Hep-2 Cells Treated With Either 2-(a-Hydroxybenzyl)- Benzimidazole or Guanidine HCl, *Journal of General Virology* 6: 151-161
75. Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin.Microbiol. Rev.* 11(1): 202 – 227
76. Palacios, G., & Oberste, M. S. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol*, 11(5), 424-433.
77. Murray P.R., Posenthal K.S., Kobayashi G.S., et al. (1998) Picornaviruses. In: *Medical Microbiology* 3rd ed. St Luis: Mosby, 450-460
78. Townsend T.R., Bolyard E.A., Volken B.H., et al. (1982) Outbreak of Coxsackie A gastroenteritis: a complication of bone-marrow transplantation. *Lancet* 1:820-823
79. Yousef GE, Bell EJ, Mann GF, et al. (1988) Chronic enterovirus infection in patients with post viral fatigue syndrome. *Lancet*, 1: 46-150
80. Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 51, 151-178.
81. Wimmer, E., Hellen, C. U., & Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*, 27, 353-436.

82. Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., & Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev*, 23(4), 488-518.
83. Lukashev, A. N., Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E., & Ilonen, J. (2003). Recombination in Circulating Enteroviruses. *J Virol*, 77(19), 10423-10431.
84. Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., et al. (2000). Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*, 74(18), 8434-8443.
85. Kottaridi, C., Bolanaki, E., Kyriakopoulou, Z., Dedepsidis, E., Pratti, A., & Markoulatos, P. (2007). Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(4), 407-412.
86. Dedepsidis, E., Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Brakoulas, C., Levidiotou-Stefanou, S., Pratti, A., et al. (2008). Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(3), 343-351.
87. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. (1986) The primery structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 155: 202–213.
88. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 23(11): 1870–1875.
89. Kirkegaard K., and Baltimore D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47(3): 433 – 443
90. Agol, V. I. (1997). Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology*, 8, 77-84.
91. Blondel, B., Duncan, G., Couderc, T., Delpeyroux, F., Pavio, N., & Colbere-Garapin, F. (1998). Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol*, 4(1), 1-26.
92. Friedrich, F. (1996). Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol*, 40(3), 157-170.
93. Dowdle, W. R., De Gourville, E., Kew, O. M., Pallansch, M. A., & Wood, D. J. (2003). Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol*, 13(5), 277-291.
94. Liu, H. M., Zheng, D. P., Zhang, L. B., Oberste, M. S., Pallansch, M. A., & Kew, O. M. (2000). Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J Virol*, 74(23), 11153-11161.
95. Cuervo, N. S., Guillot, S., Romanenkova, N., Combiescu, M., Aubert-Combiescu, A., Seghier, M., et al. (2001). Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol*, 75(13), 5740-5751.
96. Georgopoulou, A., & Markoulatos, P. (2001). Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20(11), 792-799.
97. Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. (2002) Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.
98. Georgescu, M. M., Delpeyroux, F., & Crainic, R. (1995). Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol*, 76 (Pt 9), 2343-2348.
99. Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. (2003) Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.
100. Duggal, R., & Wimmer, E. (1999). Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology*, 258(1), 30-41.
101. Blomqvist, S., Bruu, A. L., Stenvik, M., & Hovi, T. (2003). Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol*, 84(Pt 3), 573-580.

102. Cherkasova, E. A., Korotkova, E. A., Yakovenko, M. L., Ivanova, O. E., Ereemeeva, T. P., Chumakov, K. M., et al. (2002). Long-Term Circulation of Vaccine-Derived Poliovirus That Causes Paralytic Disease. *J Virol*, 76(13), 6791-6799.
103. Martín, J., Samoilovich, E., Dunn, G., Lackenby, A., Feldman, E., Heath, A., et al. (2002). Isolation of an Intertypic Poliovirus Capsid Recombinant from a Child with Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis. *J Virol*, 76(21), 10921-10928.
104. Karakasiliotis, I., Markoulatos, P., & Katsorchis, T. (2004). Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes*, 18(2), 103-109.
105. Neu N, Rose NR, Beisel KW, et al. (1987) Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 139:3630–3636.
106. Alexander, L. N., Seward, J. F., Santibanez, T. A., Pallansch, M. A., Kew, O. M., Prevots, D. R., et al. (2004). Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA*, 292(14), 1696-1701.
107. de Quadros, C. A., Andrus, J. K., Olive, J. M., Guerra de Macedo, C., & Henderson, D. A. (1992). Polio eradication from the Western Hemisphere. *Annu Rev Public Health*, 13, 239-252.
108. Anonymous. (1999). Performance of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and incidence of poliomyelitis, 1998-1999 (as of 25 November 1999). *Wkly Epidemiol Rec*, 74(49), 421-424.
109. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Progress toward interruption of wild poliovirus transmission—worldwide, January 2004–March 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54(16):408–412.
110. SEMI-ANNUAL STATUS REPORT, JANUARY TO JUNE 2016, PROGRESS AGAINST THE POLIO ERADICATION AND ENDGAME STRATEGIC PLAN 2013-2018, World Health Organization 2016
111. [www.who.int](http://polioeradication.org), WHO Press, World Health Organization, <http://polioeradication.org>
112. An introduction to the switch from trivalent to bivalent oral polio vaccines, February 2015, World Health Organization
113. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874.
114. Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., et al. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 73(1), 152-160.
115. Maydt, J., & Lengauer, T. (2006). Recco: recombination analysis using cost optimization. *Bioinformatics*, 22(9), 1064-1071.
116. Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W70-74.
117. Bellaousov, S., & Mathews, D. H. (2010). ProbKnot: Fast prediction of RNA secondary structure including pseudoknots. *Rna*, 16(10), 1870-1880.
118. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. (2009) Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J*. 6:149.
119. Pallansch, M., Oberste, S., & Whitton, L. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 490-530). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
120. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. (2008) Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med*. 15:199–203
121. Lee HK, Jeong YS. (2004) Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol*. 70:3632–3636.
122. Kew, O. M., Sutter, R. W., de Gourville, E. M., Dowdle, W. R., & Pallansch, M. A. (2005). Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol*, 59, 587-635.

123. Kew, O. M., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., Burns, C., Shaw, J., Garib, Z., et al. (2002). Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science*, 296(5566), 356-359.
124. Shimizu, H., Thorley, B., Paladin, F. J., Brussen, K. A., Stambos, V., Yuen, L., et al. (2004). Circulation of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol*, 78(24), 13512-13521.
125. Yang, C. F., Naguib, T., Yang, S. J., Nasr, E., Jorba, J., Ahmed, N., et al. (2003). Circulation of Endemic Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol*, 77(15), 8366-8377.
126. Rousset, D., Rakoto-Andrianarivelo, M., Razafindratsimandresy, R., Randriamanalina, B., Guillot, S., Balanant, J., et al. (2003). Recombinant Vaccine-Derived Poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis*, 9(7), 885-887.
127. Adu, F., Iber, J., Bukbuk, D., Gumedde, N., Yang, S.-J., Jorba, J., et al. (2007). Isolation of recombinant type 2 vaccine-derived poliovirus (VDPV) from a Nigerian child. *Virus Res*, 127(1), 17-25.
128. Joffret, M.-L., Jégouic, S., Bessaud, M., Balanant, J., Tran, C., Caro, V., et al. (2012). Common and Diverse Features of Cocirculating Type 2 and 3 Recombinant Vaccine-Derived Polioviruses Isolated From Patients With Poliomyelitis and Healthy Children. *J Infect Dis*, 205(9), 1363-1373.
129. Rakoto-Andrianarivelo, M., Guillot, S., Iber, J., Balanant, J., Blondel, B., Riquet, F., et al. (2007). Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS Pathog*, 3(12), e191.
130. Rakoto-Andrianarivelo, M., Gumedde, N., Jegouic, S., Balanant, J., Andriamamonjy, S. N., Rabemanantsoa, S., et al. (2008). Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. *J Infect Dis*, 197(10), 1427-1435.
131. Simmonds, P. (2006). Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other Mammalian positive-stranded RNA viruses. *J Virol*, 80(22), 11124-11140.
132. Simmonds, P., & Welch, J. (2006). Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol*, 80(1), 483-493.
133. Duggal, R., Cuconati, A., Gromeier, M., & Wimmer, E. (1997). Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(25), 13786-13791.
134. Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., & Markoulatos, P. (2010). Correlation between recombination junctions and RNA secondary structure elements in poliovirus Sabin strains. *Virus Genes*, 41(2), 181-191.
135. Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*, 53(1), 25-36.
136. Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-386.

6.1 ΕΙΚΟΝΕΣ

- 1.1.1 <http://www.glyptoteket.com/explore/the-collections/artwork/man-crippled-leg>
- 1.1.2 <http://polioeradication.org/polio-today/history-of-polio/>
- 1.1.3 1) <http://www.rarenewspapers.com/view/608236> 2) <https://gr.pinterest.com/uelij/polio/>
- 1.1.4 <http://polioeradication.org/polio-today/history-of-polio/>
- 1.3.1 στοιχεία από <http://www.picornaviridae.com>
- 1.3.2 στοιχεία από <http://www.picornaviridae.com>
- 1.4.1 http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

- 1.4.2 <http://www.microbiologybook.org/mhunt/intro-vir.htm>
- 1.4.3 Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins
- 1.4.4 Academic Press, 2000
- 1.4.5 <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=p1m>
- 1.4.6 Academic Press, 2000
- 1.5.1 Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis, Nidia H De Jesus
- 1.5.2 Poliovirus Internal Ribosome Entry Segment Structure Alterations That Specifically Affect Function in Neuronal Cells: Molecular Genetic Analysis, <http://jvi.asm.org/>
- 1.6.1 <http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=504>, Picornaviruses (Enterovirus and Rhinovirus Groups). <https://www.slideshare.net/seyedmostafahoseiny/picornavirus-53753762>
- Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins
- 1.6.2 Academic Press, 2000
- 1.6.3 <http://sites.psu.edu/coreybowneportfolio/wp-content/uploads/sites/36775/2015/12/Rhinovirus.pdf>
- 1.6.4 SL Flint et al. Principles of Virology (2004). Virus structure: J Y Sgr
- 1.6.5 <http://www.microbiologybook.org/virol/polio.htm>
- 1.6.6 <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/rna2.jpg>
- 1.6.7 Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis, Nidia H De Jesus
- 1.6.8 eclass uth, virology
- 1.6.9 Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins
- 1.7.1 <http://clinicalgate.com/nonenveloped-naked-rna-viruses/>
- 1.8.1 eclass uth, virology
- 1.9.1 An introduction to the switch from trivalent to bivalent oral polio vaccines, February 2015, WHO
- 1.9.2 An introduction to the switch from trivalent to bivalent oral polio vaccines, February 2015, WHO
- 1.9.3 http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame_objective2/oral_polio_vaccine/planning/en/
- 1.10.1 INVESTMENT CASE, EXECUTIVE SUMMARY, POLIOERADICATION.ORG, DECEMBER 2016
- 1.10.2 <http://polioeradication.org/where-we-work/>
- 1.10.3 <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>

6.2 ΠΙΝΑΚΕΣ

- 1.3.1 <http://www.picornaviridae.com>
- 1.3.2 <http://www.picornaviridae.com>
- 1.7.1 Ιατρική μικροβιολογία & ιολογία, Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιωτου, Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, Β' έκδοση, κεφ 21
- 1.7.2 Ιατρική μικροβιολογία & ιολογία, Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιωτου, Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, Β' έκδοση, κεφ 22